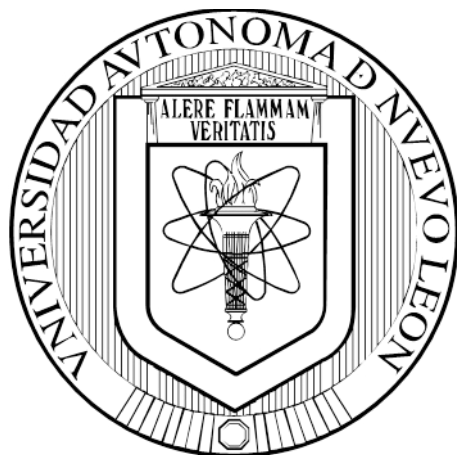


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO MURINO DE CANDIDOSIS  
DISEMINADA NEONATAL**

**POR**

**Q.F.B. ORLANDO ESAU FLORES MALDONADO**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

**JUNIO, 2017**

## ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO MURINO DE CANDIDOSIS DISEMINADA NEONATAL

Aprobación de la Tesis:



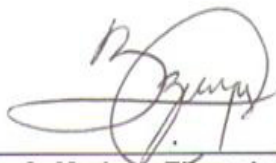
---

Dr. C. Miguel Ángel Becerril García  
Director de tesis



---

Dr. C. Romel Hernández Bello  
Co-Director de tesis



---

Dra. C. Mariana Elizondo Zertuche  
Comisión de tesis



---

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO MURINO DE CANDIDOSIS  
DISEMINADA NEONATAL**

PRESENTADO POR:

Q.F.B. ORLANDO ESAU FLORES MALDONADO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Experimental y el Centro de Control de Enfermedades Infecciosas, ambos pertenecientes al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León. La dirección de este proyecto estuvo a cargo del Dr. C. Miguel Ángel Becerril García.



---

Dr. C. Miguel Ángel Becerril García  
Director de tesis

**ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO MURINO DE CANDIDOSIS  
DISEMINADA NEONATAL**

Q.F.B. ORLANDO ESAU FLORES MALDONADO FUE BECARIO DEL  
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) CON EL  
NÚMERO DE REGISTRO 708151.

## **DEDICATORIA**

A mis padres Susana y Noé, por estar siempre conmigo, motivarme a salir adelante, por haberme apoyado en todo momento, pero más que nada, por su amor.

A los generales Aldrín, Alan y Aldo, por ser mi ejemplo a seguir y un apoyo incondicional.

A Lucero y mis sobrinas, Sophia y Romina, por llegar a complementar a mi familia.

Y finalmente, a Ana por ser mi fiel compañera, estar siempre conmigo y su amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Miguel Becerril, por su paciencia, tiempo y compartir sus conocimientos, así como su apoyo constante.

A la Dra. Gloria González, por haberme recibido en el departamento de Microbiología, compartir conocimientos y experiencias.

A Luis Rodríguez, mi amigo y hermano, por su apoyo incondicional y fundamental para la realización de este proyecto.

A mí comisión de tesis, Dr. Romel y Dra. Mariana, por compartir sus conocimientos.

A la tremendísima LH, Gerardo y Fernando, así como a Vanessa, Caro y Alexandra por llegar a ser mi familia foránea y extraordinarios amigos, compartiendo conocimientos, experiencias y aventuras de vida.

Así como a las personas que se cruzaron en mi camino, Christian, Karen, Rebeca, Gladys, Dr. Ángel, Álvaro, Byron, Francisco, Miguel, Ernesto y Marcos. Gracias por su amistad y cariño.

## TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO		PÁGINA
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1.	Generalidades de <i>Candida albicans</i>	1
1.2.	Inmunopatogénesis de la candidosis	5
1.3.	Cuadro clínico	9
1.3.1.	Candidosis mucocutánea	9
1.3.1.1	Candidosis orofaríngea	9
1.3.1.2.	Candidosis gastrointestinal	9
1.3.1.3.	Candidosis vulvovaginal	9
1.3.2.	Candidosis cutánea	10
1.3.2.1.	Candidosis intertriginosa	10
1.3.2.2.	Onicomycosis	10
1.3.3.	Candidosis invasiva	11
1.3.3.1.	Candidemia	11
1.3.3.2.	Candidosis diseminada	11
1.4.	Epidemiología de la candidosis invasiva	12
1.5.	Candidosis invasiva neonatal	13
1.6.	Factores de riesgo para la candidosis invasiva neonatal	14
1.7.	Inmunopatogénesis de la candidosis invasiva neonatal	16
1.8.	Cuadro clínico de la candidosis invasiva neonatal	18
1.9.	Diagnóstico y tratamiento	20
1.10.	Modelos murinos de candidosis invasiva	21
	JUSTIFICACIÓN	24
	OBJETIVOS	25
<b>2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
2.1.	Animales de experimentación	26
2.2.	Cepa y cultivo de <i>Candida albicans</i>	27

2.3.	Ajuste de inóculo	28
2.4.	Modelo de infección sistémica con <i>C. albicans</i>	29
2.5.	Curva de sobrevivencia	30
2.6.	Obtención de órganos	31
2.7.	Carga fúngica	31
2.8.	Análisis histológico	32
2.8.1.	Inclusión y corte de tejidos	32
2.8.2.	Tinción de laminillas	34
2.8.3.	Tinción de Hematoxilina-Eosina	34
2.8.4.	Tinción de Ácido periódico de shiff	35
2.9.	Análisis estadístico	36
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>37</b>
3.1.	Producción de tubo germinal y clamidosporas de la cepa ATCC de <i>C. albicans</i>	37
3.2.	Los ratones recién nacidos mueren a tiempos más tempranos durante la candidosis sistémica en contraste con los adultos	38
3.3.	El hígado de los ratones Rn fue el órgano que permitió el desarrollo de mayor carga fúngica durante la candidemia	41
3.4.	Determinación del daño histopatológico en los tejidos de diseminación en los ratones con candidosis invasiva	44
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>69</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Análisis macroscópico y microscópico de la cepa ATCC 66027 de <i>C. albicans</i> .	38
<b>Figura 2.</b> La mortalidad de los ratones Rn fue dependiente de la concentración, e interesantemente los Rn no mueren al administrar una cantidad de UFCs ajustadas con respecto a su peso.	40
<b>Figura 3.</b> El hígado de los ratones Rn presenta mayor carga fúngica. Interesantemente, ajustando el inóculo administrar a los Rn evidenciamos una reducción de las UFCs en la mayoría de los tejidos, durante la candidosis invasiva.	43
<b>Figura 4.</b> El hígado de ratones Rn infectados con $5 \times 10^5$ UFCs muestra una invasión y daño histopatológico severo, en comparación con la lesión tisular leve de Rn infectados con un inóculo ajustado a su peso.	46
<b>Figura 5.</b> El cerebro de los animales Rn infectados con $5 \times 10^5$ UFCs presenta una invasión y daño histopatológico severo, en comparación con la lesión tisular leve de Rn infectados con un inóculo ajustado a su peso.	49
<b>Figura 6.</b> El bazo de animales Rn y adultos muestra una lesión tisular leve durante la cinética de infección, a pesar de tener una elevada carga fúngica.	51

**Figura 7.** El riñón de animales Rn infectados presenta una invasión tisular leve por las estructuras fúngicas, en contraste a los adultos donde la lesión tisular es severa durante la candidosis invasiva.

**53**

**Figura 8.** No evidenciamos la presencia de estructuras fúngicas en el pulmón de ratones Rn y adultos infectados.

**55**

---

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Análisis semicuantitativo del daño histopatológico del hígado de ratones BALB/c con candidosis diseminada durante los días de infección.	47
Tabla 2. Análisis semicuantitativo del daño histopatológico del cerebro de ratones BALB/c con candidosis diseminada durante los días de infección.	50
Tabla 3. Análisis semicuantitativo del daño histopatológico del bazo de ratones BALB/c con candidosis diseminada durante los días de infección.	52
Tabla 4. Análisis semicuantitativo del daño histopatológico del riñón de ratones BALB/c con candidosis diseminada durante los días de infección.	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

Als	Del inglés “Agglutinin-like sequence”
CD	Células dendríticas
CLR	Receptores de Lectina tipo C
HE	Hematoxilina- Eosina
Hwp	Del inglés “Hyphal Wall protein”
IFS	Infecciones fúngicas sistémicas
Int	Del inglés “Integrin-like surface protein”
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
LPS	Lipopolisacarido
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAS	Ácido periódico de shiff
PL	Del inglés “Phospholipases”
PRR	Receptores de reconocimiento de patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rn	Recién nacidos
RMP	Revoluciones por minuto
Sap	Del inglés “Secreted aspartic proteases”
SNC	Sistema nervioso central
SSF	Solución Salina Fisiológica
TLR	Receptores tipo Toll
Th	Del inglés “Lymphocyte T helper”
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal
UFC	Unidades formadoras de colonias

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Generalidades *Candida albicans*

El género *Candida* se clasifica dentro de la clase *Ascomycetes*; familia *Saccharomycetaceae*, dicho género incluye un variado número de especies, siendo en número cerca de 200, pero sólo 58 de ellas son oportunistas en mamíferos y, de éstas, las principales especies patógenas son *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* y *Candida dublinensis* son las que presentan más infecciones humanas, sobresaliendo *C. albicans* la que, según la topografía clínica de donde se aísla, se puede encontrar entre 40 y hasta el 85% (1).

El hábitat de *C. albicans* es el humano y algunos animales homeotérmicos, crece en diferentes nichos del hospedero como un organismo comensal sin causarle daño o enfermedad (2). Es un hongo diploide con ausencia de pigmentos (melánicos y carotenoides), se reproduce de manera asexual por gemación holoblástica, sin embargo, su morfología es variable y adaptable, es decir, es un hongo pleomórfico capaz de crecer como levadura (célula redonda, elíptica u ovalada de 4 a 10 micrometros de diámetro), o de aspecto filamentoso; desarrollándose como pseudomicelio (células levaduriformes o elípticas en gemación, ensanchadas y unidas con puntos

de constricción entre células) y/o hifas verdaderas (células levaduriformes con una extensión de su pared celular en forma de tubo delgado sin producir puntos de constricción entre células) de longitud variable (3). Debido a ello, *C. albicans* es un hongo dimórfico y oportunista, que se desarrolla en forma de levadura cuando coloniza y modifica su morfología a filamentoso permitiéndole invadir y causar daño en el hospedero, este cambio de morfología se conoce como morfogénesis, el cual depende del microambiente local (temperatura, humedad, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, pH) del hongo. Se conoce que las hifas expresan numerosos factores de virulencia (adhesinas, proteasas, esterases) facilitando la invasión al tejido (3,4).

Aunado al dimorfismo, *C. albicans* es un patógeno oportunista ya que en condiciones basales es parte de la microbiota natural del ser humano colonizando el 50% de los individuos; se establece desde los primeros días del nacimiento y tiene una gran predilección por la piel y las mucosas (gastrointestinal, orofaríngea y vaginal), en estos sitios puede crecer, proliferar y coexistir sin causar daño al hospedero, debido al control de la colonización por parte del sistema inmune local y la microbiota del organismo. Sin embargo, la transición de un microorganismo comensal a un patógeno oportunista se ha asociado con alteraciones en el ambiente del hospedero como son; pH alcalino, aumento de los niveles de glucosa, humedad elevada y modificaciones en los niveles de Hierro, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> que promueve la transición de levadura a hifa, aunado a los factores de oportunismo, entre los que destacan, recién nacidos prematuros, inmunodeficiencias, alteración de la barrera cutánea y mucosa, tratamientos con inmunosupresores o con antibióticos de amplio espectro por tiempos

prolongados y el uso de procedimientos invasivos (1–3,5,6); así como los propios factores de virulencia del hongo, de los cuales, los más estudiados son las adhesinas (proteínas que median la adherencia a otras células de *C. albicans*, a otros microorganismos comensales, superficies abióticas y células hospederas); tales como las proteínas Als (por sus siglas en inglés “*agglutinin-like sequence*”) que constituyen una familia de ocho miembros (Als1-7 y Als9), la adhesina Als3 ha sido asociada principalmente en la morfología de hifa facilitando la adhesión de esta estructura. Otra importante adhesina asociada a la hifa del hongo es la proteína Hwp1 (por sus siglas en inglés, “*Hyphal Wall protein*”) y finalmente la proteína de superficie tipo integrina Int1 (por sus siglas en inglés, “*Integrin-like surface protein*”) que está presente en levadura como hifa. El papel principal de estas adhesinas es permitir el anclaje al epitelio y superficies endoteliales, mediante la unión a proteínas de matriz extracelular como la fibronectina, fibrinógeno y el colágeno tipo I y IV, así como la capacidad de formar biopelículas (comunidad de células adherentes con propiedades distintas de las de las células flotantes “planctónicas”), las biopelículas de *C. albicans* se desarrollan mediante la adherencia de las células del hongo en superficies sólidas como catéter y prótesis, posterior a la adhesión inicia una proliferación de células para formar una capa de anclaje a la superficie y la acumulación de las distintas morfologías del hongo como levaduras, pseudohifas e hifas, todas estas células se encuentran embebidas en una matriz extracelular, la formación de una biopelícula madura se da entre las primeras 24 horas, estas estructuras son intrínsecamente resistentes a la terapéutica antifúngica, el sistema inmune del huésped y otras

perturbaciones ambientales. Por otro lado, se encuentran las enzimas hidrolasas secretadas las cuales facilitan la penetración del hongo a las células hospederas y la adquisición de nutrientes, dentro de estas enzimas destacan las proteasas y fosfolipasas. Las proteasas asparticas secretadas Sap (por sus siglas en inglés, “*secreted aspartic proteases*”) comprenden diez miembros Sap1-10. Sap 1-8 son enzimas secretadas y mientras que Sap9-10 permanecen en la superficie del hongo, y finalmente las fosfolipasas PL (por sus siglas en inglés, “*Phospholipases*”) que constan de 4 miembros PL A-D, estas enzimas secretadas facilitan la invasión a tejidos, una vez que invade el tejido del hospedero *C. albicans* se expone a distintos pH que varían de un pH ligeramente alcalino a ácido dependiendo del sitio de invasión, por lo que el hongo es capaz de adaptarse a dichos cambios, debido a la producción de proteínas importantes para la adaptación a los cambios de pH como; Phr1 y Phr2, los cuales son expresadas en un pH alcalino y acido, respectivamente. Así como su capacidad de cambiar morfológicamente de levadura a filamento (6–8)

Todo este conjunto de factores de virulencia, así como los factores de predisposición y de oportunismo, le permiten al hongo ocasionar una afección grave en el sitio de invasión, conocida como candidosis, la cual es una enfermedad micótica causada por diversas especies de levaduras oportunistas del género *Candida*, en especial *C. albicans* y el grupo *Candida no-albicans*; esta afección presenta una variedad de cuadros clínicos; como lo es candidosis cutánea la cual afecta en particular piel y uñas, candidosis mucocutánea que afecta a la mucosa gastrointestinal, genital y oro-faríngea,



sin embargo, la afección más grave es la candidosis invasiva, debido a que presenta una elevada mortalidad (1,9,10).

La severidad de las micosis oportunistas depende principalmente de la incapacidad del sistema inmune del individuo para limitar el proceso infeccioso, de los factores de virulencia del hongo y de las condiciones del microambiente en que se lleva a cabo la interacción hospedero-parásito.

## 1.2. Inmuno-patogénesis de la candidosis

La piel y las mucosas epiteliales son componentes importantes del sistema inmune innato, es decir, son la primera línea de defensa frente a diversos patógenos, dichas estructuras funcionan como barrera física que en conjunto con la microbiota local de estos sitios frenan la invasión de los microorganismos patógenos (11). Es bien conocido que *C. albicans* presenta una extraordinaria capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y nichos del ser humano, permitiéndole colonizar la piel y las mucosas del humano,

La colonización comienza cuando las levaduras de *C. albicans* se adhieren al epitelio del hospedero a través de sus adhesinas y otras proteínas de su pared celular, a continuación, el hongo puede crecer y proliferar en estos sitios sin causar daño al hospedero, debido a distintos mecanismos de control de la colonización como son; La piel y las mucosas que participan como barreras físicas, las células epiteliales las cuales producen péptidos antimicrobianos (la lactoferrina, las  $\beta$ -defensinas, las histatinas, la lisozima, la transferrina, la lactoperoxidasa) en respuesta a la unión del hongo y

finalmente la microbiota local la cual compite con el hongo por la disposición de nutrientes y la superficie para colonizar, todo este conjunto de respuestas permiten mantener un número limitado de levaduras y controlado que no induce daño a las células epiteliales o las mucosas (11,12). Sin embargo bajo ciertas circunstancias, por ejemplo la alteración de la microbiota por el uso de antibióticos, cambios de pH y/o acumulación de nutrientes como el glucógeno; o bien debido a enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular. Favorece el incremento del número de levaduras de *C. albicans*, así como también realizar el cambio de morfología de levadura a hifa, las pseudohifas e hifas forman una biopelícula robusta que se adhiere fuertemente al epitelio debido a la producción de nuevas adhesinas y finalmente estas estructuras fúngicas producen enzimas hidrolíticas previamente mencionadas, permitiendo invadir las células epiteliales causando invasión y daño al tejido (8,13).

Durante las primeras horas de la invasión del hongo al tejido, las células epiteliales, por ejemplo, los queratinocitos en la infección cutánea comienzan la respuesta inmune, estas células expresan receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs). Se ha descrito *C. albicans* se adhiere y/o es reconocido por algunos PRRs de dichas células induciendo la expresión y producción de algunas citocinas pro-inflamatorias y quimiocina, además los queratinocitos expresan receptores para Factor de Necrosis Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-22, estas citocinas actúan en las células epiteliales induciendo la producción de péptidos antimicrobianos como  $\beta$ -defensinas para el control de la infección y además produce quimiocinas, como IL-8 que favorece el

reclutamiento de neutrófilos y otras células inflamatorias al sitio de infección (14).

Las distintas estirpes celulares de la respuesta inmune innata (células dendríticas, macrófagos y neutrófilos) que se localizan en el sitio de la infección, reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de *C. albicans* (principalmente componentes de la pared celular del hongo) a través de las diversas familias PRRs que expresan estas células inmunes. Dentro de los PRRs se encuentran los Receptores tipo Toll (TLR) específicamente TLR-2 y 4 que se unen a mananos y mananoproteínas, respectivamente. Otra familia importante en el reconocimiento son los Receptores de Lectina C (CLR) como es dectin-1 y 2 reconocen  $\beta$ -glucanos y mananos, respectivamente. La unión de los PAMPs a los PRRs induce la producción de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, producción de especies reactivas de oxígeno, además promueven internalización y fagocitosis del hongo (14–16). Este reconocimiento inicial del hongo por las células epiteliales y células inmunológicas innatas promueven una inflamación en el sitio de la infección. Sin embargo, *C. albicans* tiene la capacidad de evadir la respuesta inmunológica innata por múltiples mecanismos como; ocultar los PAMPs de su pared celular para evitar el reconocimiento por las células hospedadoras, inhibe la maduración del fagolisosoma dentro de las células fagocíticas, induce la transición morfológica para liberarse de las células fagocíticas, entre otros mecanismos (7,15). Por otro lado, las hifas del hongo continuarán con la invasión del tejido, mediante la producción de proteasas (Sap) y fosfolipasas,

ocasionando la muerte celular de las células del hospedero y por ende la liberación del contenido celular evocando una respuesta inflamatoria (7).

Las células dendríticas (CD) son esenciales durante las primeras horas y días de infección ya que al igual que los macrófagos, éstas pueden fagocitar y eliminar al hongo, pero son menos eficientes que los macrófagos, sin embargo las CD puede fagocitar, procesar y migrar a los ganglios linfáticos próximos para presentar antígenos a los linfocitos Th *naive* dentro de los primeros 5-7 días de infección, induciendo una respuesta de células Th específica contra *C. albicans* de tipo Th1 o Th17 entre los 10-14 días posteriores a la infección (17–19). La respuesta Th1 y la producción de IFN $\gamma$  es importante para promover las actividades antifúngica en macrófagos, esta respuesta se ha asociado a una protección sistémica, mientras que la respuesta Th17 y la producción de IL17 es también importante para la defensa contra *C. albicans*, esta respuesta de tipo 17 induce el reclutamiento y activación de neutrófilos al sitio de infección, se asocia a una protección mucocutánea (20–22).

Por otro lado, si la infección persiste debido a la evasión de la respuesta inmune y/o la modulación hacia una respuesta permisiva por parte del hongo, esto favorecerá a *C. albicans* para que continúe invadiendo el tejido y eventualmente encontrarse con los vasos sanguíneos permitiendo al hongo entrar a vía sistémica y finalmente diseminar a distintos órganos o tejidos en el hospedero ocasionando la candidosis invasiva (23,24).

### 1.3. Cuadro clínico

La candidosis presenta una gran variedad de manifestaciones clínicas, las cuales se describen, a continuación;

#### 1.3.1. Candidosis mucocutánea

##### 1.3.1.1. Candidosis oro-faríngea

Llamada comúnmente algodoncillo, es frecuente en niños recién nacidos debido a la falta de regulación de pH y elevada humedad, se contrae por un fuerte inóculo adquirido a través del canal del parto. La candidosis oral aguda se localiza en lengua y paladar se caracteriza por una capa blanca, adherente y membranosa, de bordes difusos y dispuesta sobre una base eritematosa, cuyo síntoma es el dolor. La membrana blanca es el conjunto de células epiteliales descamadas, fibrina, leucocitos, pseudohifas y levaduras unidos al epitelio inflamado (1).

##### 1.3.1.2. Candidosis gastrointestinal

Involucra esófago, estómago e intestino, la afección esofágica inicia por la colonización en la boca y aparece en pacientes tratados con antibióticos, corticoides, radiaciones y con diabetes. Los síntomas clínicos más frecuentes son odinofagia, disfagia, dolor retroesternal, hemorragia, náuseas, vómitos. Mientras que en el tracto gastrointestinal el hongo ocasiona lesiones ulcerativas, acompañadas de diarrea (1).

##### 1.3.1.3. Candidosis vulvovaginal

Esta forma se asocia con mayor frecuencia a etapas del ciclo menstrual y al embarazo. La mucosa vaginal y la vulva presentan eritema intenso que

puede extenderse a pliegues inguinales y periné, generalmente se presenta dispareunia y leucorrea, dicha secreción se caracteriza por la presencia de secreción espesa y grumosa, de aspecto lechoso, blanco o amarillo y placas pseudomembranasas de color grisáceo, que se encuentra en la mucosa vaginal, toda la zona vaginal está muy inflamada y por lo general, el prurito es muy extenso (1,12).

### 1.3.2. Candidosis cutánea

#### 1.3.2.1. Candidosis intertriginosa

Cualquier pliegue del cuerpo puede ser afectado, una de las principales causas predisponentes para la infección es la diabetes (modifica el estado bioquímico de la piel, produce aumento de glucógeno y acidez), además el calor, humedad y la maceración de la piel favorecen el desarrollo de la infección, las lesiones se caracteriza por placas eritematosas, maceración, descamación fina, fisuras, lesiones satélites (pústulas, pápulas o vesículas). En caso de afectarse los espacios interdigitales, el signo principal es la maceración intensa, con escamas gruesas y blancas (1).

#### 1.3.2.2. Onicomycosis

La infección comienza generalmente por el pliegue periungueal, generando una inflamación y enrojecimiento ocasionando dolor. Cuando la levadura invade la uña, la placa ungueal, cambia de color, se vuelve parduzca, engrosada, endurecida y se forman estrías o surcos (1).

### 1.3.3. Candidosis invasiva

#### 1.3.3.1. Candidemia

Consiste en el hallazgo del hongo en muestras de hemocultivo y en ausencia de compromiso visceral demostrable, exceptuando la localización mucocutánea. Puede ser transitoria o persistente. Desde el punto de vista clínico la candidemia se manifestará como sepsis, sepsis grave o shock séptico de origen nosocomial (1).

#### 1.3.3.2. Candidosis diseminada

La infección diseminada se produce en muchos casos por la siembra hematógena del hongo, afectando a múltiples órganos citándose como los más frecuentes: pulmones, riñones, cerebro, ojos, corazón, bazo e hígado. En todos estos casos es necesario demostrar la presencia del hongo en los tejidos comprometidos, a través de estudios histopatológicos.

La candidosis diseminada aguda; presenta fiebre persistente que no responde a los antibióticos. Otros síntomas son: mialgias, disfunción renal y lesiones nodulares cutáneas "rash". También pueden aparecer endoftalmitis, meningitis, absceso cerebral, endocarditis, neumonía. En contraste a la candidosis diseminada crónica la cual es casi exclusivamente observada en pacientes neutropénicos. Afecta principalmente a hígado y bazo ocasionado hepatoesplenomegalia, se pueden encontrar lesiones con localización en riñones y pulmones (además de en hígado y bazo) (1,23).

#### 1.4. Epidemiología de la candidosis invasiva

La candidosis invasiva se refiere a la presencia de levaduras del género *Candida* en sistema circulatorio y por consiguiente en varios órganos del hospedero, como corazón, pulmón, cerebro, riñón, hígado y bazo. En los últimos años *Candida spp.* se ha posicionado como el principal agente patógeno en causar infecciones fúngicas sistémicas (IFS), además es el cuarto patógeno más común en ocasionar infecciones de vía sistémica en pacientes hospitalizados en los Estados Unidos de América y Europa, solamente superado por bacterias del género *Staphylococcus* y *Enterococcus* (25,26).

La incidencia global de candidosis invasiva es de 72-290 infecciones por un millón de personas al año (26,27). Diversos estudios epidemiológicos han reportado; la incidencia de esta afección en España es de 0.92 por cada 1000 admisiones, Europa de 0.41-1.09 por cada 1000 admisiones, en Brasil es de 2.49 por 1000 admisiones, mientras que en México la incidencia anual es de 8.6 casos por cada 100 000 habitantes (9,28–30).

Aproximadamente el 95-97% de todas las IFS asociadas a *Candida* son causadas por 5 especies: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, y *Candida krusei*. Sin embargo *C. albicans* es aún el principal agente etiológico de las candidemias y se ha descrito que al menos el 50% de episodios de candidemia ocurre en la Unidad de Cuidados Intensivos (27,31). La candidosis invasiva es una infección sistémica que puede ocasionar una mortalidad del 40% de los pacientes



aquejados y la tasa de incidencia para esta afección alcanza su máximo en los neonatos y adultos mayores (25).

#### 1.5. Candidosis invasiva neonatal

Los recién nacidos (Rn) son un grupo de riesgo altamente vulnerable para adquirir infecciones microbianas, por bacterias como; *Streptococcus* del grupo B (32,33), *Staphylococcus aureus* (34,35), *Escherichia coli* (36,37), dentro de las infecciones virales destacan las causadas por *Enterovirus* (38), virus sincitial respiratorio (39) y finalmente las infecciones fúngicas principalmente ocasionadas por *Candida spp.* causante de la candidosis invasiva neonatal (31).

La candidosis invasiva presenta altas tasas de incidencias en pacientes menores de 1 año de vida, Kao y colaboradores determinaron la incidencia de candidemias en neonatos humanos (menores de 30 días de vida) en dos ciudades de los Estados Unidos de América y encontraron que por cada 100 000 neonatos 466 adquieren la infección (40). En Barcelona la incidencia de candidosis invasiva neonatal fue de 32.6 casos por cada 100 000 nacimientos, en China la incidencia aumentó en los últimos años a 158.9 por 1000 admisiones, mientras que en Monterrey N.L. México del 2007 al 2010 se registraron 398 casos de candidemias y el 42.7% corresponde a niños menores de 1 año (41–44).

La candidosis invasiva neonatal es una importante causa de morbilidad y mortalidad en neonatos, especialmente en Rn prematuros. En los países en

vías de desarrollo, la candidosis invasiva es la segunda causa más común de muertes relacionadas con enfermedades infecciosas en Rn extremadamente prematuros en las Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN), a pesar de la terapia antifúngica el 20% de los Rn mueren por esta afección, mientras que un gran porcentaje de los Rn que sobreviven presentan alteraciones en su crecimiento y en el desarrollo neurológico, ocasionando un impacto drástico en su vida (45–48).

Al igual que en los adultos *C. albicans* es el principal agente etiológico de las candidemias, seguido de *C. parapsilosis* que se posiciona como el segundo patógeno en causar IFS en Rn e infantes. La tasa de mortalidad por candidosis invasiva en Rn e infantes es más alta de 43-54% en comparación con la mortalidad de los adultos (45,47,48).

#### 1.6. Factores de riesgo para candidosis invasiva neonatal

Los principales factores de riesgo para el establecimiento de la candidosis invasiva neonatal son Rn prematuros (menores a 37 semanas de gestación) y/o Rn de bajo peso al nacer, estudios de vigilancia epidemiológica han demostrado que el incremento en la incidencia de esta afección se correlaciona con estos factores de riesgo, además los Rn con peso extremadamente bajo al nacer (<1000g de peso al nacer) presentan 10 veces más riesgo de desarrollar candidosis invasiva neonatal durante su primer año de vida (48–51).

La colonización previa de piel y mucosas en los Rn es un riesgo importante, dicha colonización con *Candida* en los neonatos es adquirida durante los primeros días del nacimiento y puede ser por transmisión materna, es decir durante el nacimiento a través del canal parto o de origen nosocomial, a través del contacto con el personal de la salud (52). Por otro lado, una mayor estancia en la Unidad de Cuidados Intesivos Neonatal (UCIN), así como el uso profiláctico de antibióticos de amplio espectro también se ha visto que favorece el desarrollo de la infección, mientras que el uso de catéter venoso central y/o nutrición parenteral en este grupo de edad, son uno de los más comunes factores de riesgo que contribuyen al aumento de las candidosis invasivas en la UCIN (46,50,53).

Finalmente, Los Rn prematuros presentan un sistema inmune en proceso de desarrollo y maduración al nacer, la mayor parte de sus funciones son pobres o deficientes en comparación con los adultos (54). Por ejemplo, se ha descrito que el número de células del sistema inmune se encuentran disminuido en los Rn en comparación con adultos (55), Además de estas diferencias cuantitativas, algunos estudios en neonatos tanto en ratones como en humanos, han mostrado diferencias cualitativas las cuales incluyen: subpoblaciones celulares que están presentes en diferentes proporciones, además de diferencias fenotípicas y funcionales en la misma población celular, todo ello comparado con las células de los adultos (56–59). Por lo que, esta inmadurez del sistema inmune en el Rn, es posiblemente un factor de riesgo para la candidosis invasiva neonatal.

### 1.7. Inmuno-patogénesis de la candidosis invasiva neonatal

La patogénesis de la candidosis invasiva en adultos ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, sin embargo existe muy poca información sobre la patogénesis de esta infección en el Rn. Se ha descrito que *Candida spp* es microbiota normal del humano y es frecuentemente localizada en tracto gastrointestinal, genitourinario y piel. Los Rn admitidos a la UCIN son colonizados por *Candida* rápidamente después de nacer, los sitios más frecuentemente colonizados son el tracto gastrointestinal y respiratorio durante las 2 primeras semanas de vida (60), la colonización durante este periodo de edad está relacionado con el proceso de nacimiento: los infantes nacidos durante un parto normal tienen mayor riesgo de colonización que los infantes nacidos por cesárea. Mientras que la colonización de infantes mayores a 2 semanas de edad ocurre principalmente en la piel y puede estar relacionado con el contacto de la piel materna y/o el personal de la salud (52,61). La piel durante el periodo neonatal presenta una gran cantidad de células T reguladoras en comparación con la piel de adultos, la función de estas células durante este periodo de vida es crucial para mediar la colonización y tolerancia a microorganismos (62). Por otro lado, la piel y las mucosas de los Rn prematuros no están totalmente desarrolladas facilitando la invasión por *Candida spp*, se ha descrito que la epidermis de Rn menores a 30 semanas de gestación es de menor grosor y presenta una menor cantidad capas celulares y un estrato corneo en proceso de desarrollo en comparación con la piel de los recién nacidos a término (63) la función de barrera física del tracto gastrointestinal de los Rn prematuros es pobre en comparación con adultos, debido a la aumentada permeabilidad de la

mucosa intestinal, baja producción de moco protector y a un menor número de uniones intracelulares, actualmente, es poco conocido sobre la maduración de proteínas de uniones estrechas, como occludina y claudinas durante el periodo neonatal, lo que posiblemente hace a los Rn altamente susceptibles a la invasión del hongo (64).

Una vez que *Candida spp* invade la piel y mucosa se inicia el establecimiento de la candidosis invasiva. Otro mecanismo para el desarrollo de esta afección es la administración accidental de levaduras directamente al torrente sanguíneo mediante el uso de catéter venoso central aunado con la capacidad del hongo de generar biopelícula para el establecimiento de la candidosis invasiva. Una vez en sangre el hongo tiene la predilección de invadir tejidos como es el sistema nervioso central, riñón, hígado, bazo, corazón y retina. En Rn el sistema nervioso central (SNC) es uno de los principales sitios de diseminación ocasionando meningitis por *Candida spp*. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales el SNC es de los tejidos mayormente afectados en el Rn prematuro humano. Por lo que será interesante elucidar los mecanismos de diseminación, patogenia y/o respuesta inmune en este sitio (53,65–67).

Es un hecho que la respuesta inmune del hospedero tiene una función importante para el control de las infecciones fúngicas, como la candidosis. Sin embargo, el Rn humano presenta su sistema inmune en proceso de maduración y desarrollo, es decir, la mayor parte de sus funciones son pobres en comparación los adultos, previamente se ha descrito que la inmunidad celular es deficiente debido a que los Rn prematuros presentan

menor cantidad de neutrófilos y linfocitos T en comparación con los Rn de término, al comparar ambos grupos con animales adultos tanto los neutrófilos de Rn prematuros como los Rn de término presentan una disminuida quimotaxis y menor capacidad de fagocitosis (54,58,68).

Actualmente existen muy pocos estudios sobre la respuesta inmune neonatal contra infecciones por *C. albicans* en Rn. En un estudio previo se aislaron neutrófilos de sangre de cordón umbilical de Rn a término y prematuros, los resultados muestran que no hay diferencias en el estallido oxidativo producido por Rn (término y prematuros) en comparación con neutrófilos adultos cuando son estimulados con *C. albicans* y *C. parapsilosis*. Asimismo no se observaron diferencias en la capacidad de fagocitosis entre los grupos (69). En un modelo de candidosis intrauterino durante el embarazo temprano en ovejas, se demostró que el feto desarrolla infección sistémica con una caracterizada invasión de hifas en epidermis, dermis y pulmón. Así como también se describió que el feto produce una respuesta inflamatoria severa con la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (70).

#### 1.8. Cuadro clínico de candidosis invasiva

La candidemia es la manifestación clínica más frecuente de la candidosis invasiva, la cual se caracteriza por el desarrollo de sepsis y shock séptico debido una respuesta pro-inflamatoria contra el hongo en sangre. Otras manifestaciones clínicas son peritonitis, meningitis, osteomielitis, endocarditis, endoftalmitis, absceso visceral (en hígado y bazo) e

insuficiencia renal. Informes de autopsias mostraron que los riñones y pulmones son los órganos más afectados, sin embargo, también se encontraron lesiones en corazón, hígado y bazo (10,66,71).

La clínica de la candidosis invasiva neonatal difiere de la enfermedad invasiva en adultos mayores. El Rn es más probable que presente signos y síntomas no específicos o sutiles a una infección, se ha descrito que los Rn con candidiasis invasiva frecuentemente presentan características sugestivas de sepsis y shock péptico, incluyendo letargo o apnea, intolerancia alimentaria, inestabilidad cardiorrespiratoria e hiperbilirrubinemia. Sin embargo, la manifestación clínica de mayor importancia en los Rn es la meningitis, este grupo de riesgo tienen un alto riesgo de tener complicaciones en el sistema nervioso central y se debe sospechar de meningoencefalitis (47,66,67).

Previos estudios han mostrado que los Rn con candidosis invasiva mueren dentro de las primeras 72 horas de vida, además se ha descrito que un alto porcentaje de los Rn que sobreviven a esta afección presentan deterioro del desarrollo neurológico, un estudio de seguimiento de 18-22 meses en Rn con extremado bajo peso al nacer lo cuales presentaron candidosis invasiva durante los primeros días de vida, se observó que el 73% de los Rn murieron o presentan alteraciones en el desarrollo neurológico, parálisis cerebral, ceguera, deficiencia auditiva, déficits cognitivos (48,72,73).

La endoftalmitis neonatal resulta de la diseminación hematógena del hongo al ojo en recién nacidos prematuros. La enfermedad ocular puede ocurrir en el primer día, pero es más probable con candidemia prolongada (74)

### 1.9. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la candidosis invasiva es un gran reto para el laboratorio, la prueba estándar de oro es el cultivo, en particular el cultivo de sitios estériles como sangre, líquido peritoneal, líquido pleural y líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, los cultivos de dichas muestras presentan una sensibilidad muy baja, lo que vuelve más complicado el diagnóstico de esta infección y retardando el inicio de la terapia antifúngica, aumentando la tasa de mortalidad en los pacientes. Además del cultivo existen otras pruebas de detección para las candidosis invasiva como es la detección de antígenos ( $\beta$ -glucanos), anticuerpos y en la última década se ha incorporado el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), estas pruebas están entrando en la práctica clínica como un apoyo al cultivo (67,75,76), por lo que la detección temprana de biomarcadores y/o marcadores moleculares es necesaria para el diagnóstico y/o pronóstico de la infección, pero para la búsqueda de estos marcadores se requiere el entendimiento molecular de la fisiopatología e inmunología de esta afección en el periodo neonatal.

Se ha observado que la reducción de la mortalidad está estrechamente asociada con el inicio temprano de la terapia antifúngica y el control de la fuente de la infección (como catéter u otros procedimientos invasivos), la duración de las candidemias después del tratamiento antifúngico sistémico en los Rn humanos que sobreviven es aproximadamente de 3 días, además la eliminación temprana de catéteres es un buen pronóstico durante las candidemias (75,76).



De acuerdo con las guías de manejo para la candidodis invasiva de la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, por sus siglas en ingles) y de la Sociedad Europea de Microbiología y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) se recomienda el uso de Anfotericina B *desoxicolato* (AmBd) en neonatos con candidosis invasiva, el fluconazol en pacientes neonatos que no han estado recibiendo fluconazol previamente como profiláctico, el uso de equinocandinas deben utilizarse con precaución y solo en situaciones de resistencia. Además el grupo de expertos de la ESCMID y IDSA, ha evaluado tres estrategias profilácticas para candidosis invasiva en Rn prematuros: (1) la utilización de agentes antifúngicos orales no absorbibles; (2) Administración oral de *Lactobacillus* y lactoferrina; (3) Y la administración de fluconazol (75,76).

#### 1.10. Modelos experimentales de candidosis invasiva

Los modelos experimentales han sido ampliamente utilizados para la comprensión de la patogénesis de la candidiasis invasiva durante la adultez. El modelo murino de infección intravenosa es el más comúnmente utilizado, este modelo ha sido desarrollado para imitar los principales sitios de diseminación de *C. albicans* durante las infecciones sistémica, el modelo se basa en la administración directa de las levaduras en el torrente sanguíneo, con la consiguiente diseminación a distintos tejidos, el principal órganos afectado en los modelos murinos en adultos es el riñón (77), y además se ha descrito que la inflamación sistémica, así como el rápido deterioro de los animales se asemeja a la sepsis hiper-inflamatoria. Estos modelos han

permitido realizar el análisis de la respuesta inmune inducida por la candidosis invasiva en ratones adultos (22,77,78) Otro modelo murino comúnmente utilizado es la infección gastrointestinal, el cual se basa en la administración de levaduras a través de una sonda vía oral con la posterior colonización e infección del tracto gastrointestinal y finalmente la diseminación a distintos tejidos (79,80). Tales modelos de infección han sido utilizados para identificar factores de virulencia, analizar la respuesta inmune, determinar la influencia de polimorfismos en la respuesta inmune y/o probar terapias antifúngicas (81–84).

Actualmente se han establecido 2 modelos de candidosis invasiva en ratones neonatos, la importancia de ambos modelos es que no fue necesario el pretratamiento con antibióticos de amplio espectro o agentes inmunosupresores para el establecimiento de la enfermedad invasiva. El primero de ellos utilizó ratones neonatos de 5-7 días de vida, los animales se infectaron administrando *C. albicans* vía oral ocasionando la infección gastrointestinal, interesantemente se observó que dentro de las primeras 6 a 72 horas de infección comienza la invasión a órganos extraintestinales como hígado, riñón y bazo. Recientemente se desarrolló un modelo murino neonatal de candidosis invasiva utilizando ratones Rn de 2 días de vida, la infección se realizó administrando *C. albicans* vía intraperitoneal, similar al modelo anterior se evaluó la sobrevivencia de los ratones, la carga fúngica de los sitios de diseminación y finalmente se realizó el análisis histopatológico, en este modelo se observó que la mortalidad de los animales depende de la dosis y la invasión del hongo fue riñón, pulmón y cerebro (85,86). Si bien en estos modelos se establece la candidosis invasiva,

ambos modelos presentan algunas limitantes, como es; la vía de administración del hongo, la edad de los animales, el análisis de sólo 2 tejidos y los tiempos de análisis de carga fúngica y/o histopatología. Por lo que el desarrollar un modelo murino de candidosis invasiva a tiempos más tempranos de vida (ratones menores a 24 horas de vida) que asemeje lo mayormente posible al Rn prematuro humano, así como la administración directa del hongo al torrente sanguíneo permitirá emular la patogénesis de las candidosis invasivas en neonatos humanos.

Recientemente se han desarrollado 2 métodos de inyección intravenosa para ratones neonatos; (1) Inyección en la vena yugular externa e (2) inyección en la vena temporal por transiluminación. De ambas técnicas la inyección a través de la vena yugular externa es la técnica más recomendada, debido a que la vena yugular externa es un vaso de gran calibre, fácilmente visible y además es tolerante a la concentración de inyectados, esta técnica ha sido utilizada para la administración de células (como células de médula ósea), medicamentos y citocinas (87). En el 2012 esta técnica se utilizó para establecer un modelo de bacteremia por *Staphylococcus epidermidis* en ratones Rn menores de 24 horas, este modelo permitió evaluar mecanismos de la respuesta inmune innata (88).

## JUSTIFICACIÓN

La candidosis invasiva presenta una incidencia a nivel mundial de 70-280 casos por cada millón de habitantes en el mundo, los recién nacidos y adultos mayores son los grupos de edad más susceptibles para adquirir esta infección, sin embargo, los Rn prematuros presentan 10 veces más el riesgo de adquirir esta afección, la cual presenta una mortalidad entre el 40-50% durante el periodo neonatal. Y un elevado porcentaje de los Rn que sobreviven presentan alteraciones en su desarrollo neurológico.

La patogénesis durante la candidosis invasiva ha sido ampliamente estudiada en seres humanos y modelos experimentales adultos, sin embargo, es muy poco lo que se conoce sobre la fisiopatología y los mecanismos de la respuesta inmune que se establecen durante esta infección en el periodo neonatal.

Por cuestiones éticas difícilmente pueden realizarse estudios *in vivo* en recién nacidos humanos, es por ello que consideramos necesario, el establecer un modelo de candidosis diseminada en ratones menores de 24 horas de vida mediante la administración directa de *C. albicans* en circulación sistémica, lo que permitirá a futuras investigaciones conocer más a profundidad la inmuno-patogénesis en este grupo de riesgo, así como la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico y/o el pronóstico de la enfermedad durante el periodo neonatal.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Establecer un modelo de candidosis diseminada en ratones BALB/c menores a 24 horas de vida.

### Objetivos específicos

- Analizar la sobrevivencia de ratones Rn con candidosis diseminada, utilizando distintas concentraciones de levaduras como inóculo.
- Evaluar carga fúngica y daño histopatológico de riñón, bazo, hígado, cerebro y pulmón extraídos de ratones Rn con candidosis diseminada.
- Comparar los resultados obtenidos de los animales Rn con adultos infectados con *C. albicans* intravenosamente.

## CAPÍTULO 2

### 2. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

#### 2.1. Animales de experimentación

El protocolo experimental de este proyecto fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), así como por el Comité de Investigación y Ética de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo el número de registro MB17-00001. Se utilizaron ratones de la cepa BALB/c, menores de 24 horas de edad (Recién nacidos) y hembras de 6-7 semanas (18-20 gramos de peso) de edad, mismos que se alojaron bajo condiciones de libres de patógenos en el equipo LAB &Bio (ProBio-Tech), el cual funciona con presión negativa y se ubica dentro del Laboratorio de Microbiología Experimental (LME) del Departamento de Microbiología. Los animales de experimentación se conservaron bajo condiciones estándares de alimentación (*ad libitum*) temperatura controlada 18-26°C, humedad controlada 40-70% y bajo las normas adicionales establecidas en el Manual de procedimientos, seguridad y bioseguridad del LME (con el siguiente código de documento; LME-MPSBS-997-MAN) y el Procedimiento Normalizado de Operación para el Manejo de Animales de Experimentación (con el siguiente código de documento; LME-PMA-997-PNO), así mismo el LME cuenta con el siguiente número de autorización de SANASICA AUT-B-B-1216-029. Para todos los experimentos realizados en este proyecto se utilizaron 3 grupos experimentales; grupo infectado, grupo

vehículo y grupo control. Para cada grupo experimental se contaron con 4 ratones por ensayo.

## 2.2. Cepa y cultivo de *C. albicans*

En todos los experimentos se utilizó la cepa de *C. albicans* ATCC con el número de catálogo 66027, la cual se encuentra bajo resguardo en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosa del Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, UANL. El hongo se encuentra almacenado en viales que contienen medio líquido Sabouraud al 30% con glicerol estéril a -70 grados Celsius.

Previamente a los experimentos, a partir del lote semilla de *C. albicans*, se obtuvo un lote de trabajo, el cual se utilizó para todos los ensayos de este proyecto. Del lote de trabajo se descongeló un vial de *C. albicans* en baño maría a una temperatura de 37 grados Celsius durante 5 minutos en agitación constante, posteriormente se depositó el volumen del vial en un tubo cónico de 50 mL con la ayuda de una micropipeta y se agregaron 15 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF) con la pipeta Pasteur, para posteriormente centrifugar a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, a continuación se decantó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 mL de SSF, se tomaron 50 µL del homogenizado y fueron sembrados en Agar Mycosel a 30°C, cada 48 horas de incubación se realizó el pase del hongo a un nuevo medio de Agar Mycosel con la ayuda de un aplicador de madera y se incubaron a 30°C, solo los cultivos del hongo que

se encontraban entre el pase 4-10, fueron utilizados para los experimentos, cuando se alcanzó este número de pases se descongelaron nuevos vial.

Para verificar la autenticidad de la cepa ATCC se realizó la prueba de tubo germinal y la producción de clamidosporas. Para la prueba de tubo germinal se realizó la siguiente metodología: a partir de un cultivo de 48 horas se obtuvo cantidad suficiente del hongo y se sembró en aproximadamente 0.5 mL de suero humano, posteriormente se incubó a 37 °C durante 3 horas, una vez concluido el tiempo, se practicó un examen en fresco observándose bajo el microscopio. Mientras que para la producción de clamidosporas se utilizó agar harina de maíz al que se le agregó tween 80, se sembró el hongo en el agar y se incubó a 30 °C durante 72 horas, una vez pasado el tiempo se practicó un examen en fresco observándose al microscopio. Para la prueba de tubo germinal se debe observar una extensión filamentosa de las levaduras, mientras que para la prueba de clamidosporas se debe buscar estructuras redondas de pared gruesa, presentes en la pseudohifa en los extremos o intercalares.

### 2.3. Ajuste de inóculo

Se colectó mediante un hisopo estéril muestras a partir de cultivos entre 24 y 48 horas de incubación (entre los pases 4-10), las levaduras fueron resuspendidas en un tubo cónico que contiene 15 mL de Solución Salina Fisiológica (SSF), posteriormente fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos, al finalizar se decantó el sobrenadante y el pellet se homogenizó con 15 mL de SSF, se efectuó una segunda centrifugación, a continuación el



sobrenadante se decantó y el pellet se homogenizó en 5 mL de SSF. Enseguida a ello, se realizó una serie de diluciones 1:10 de la suspensión obtenida y las levaduras fueron contadas mediante la cámara de Nuebauer por duplicado y finalmente se efectuó los cálculos necesarios para el ajuste del inóculo para cada experimento.

Para el ensayo de sobrevivencia los ratones adultos se infectaron con las siguientes concentraciones  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  levaduras de *C. albicans* en 200  $\mu$ L, mientras que para los ratones recién nacidos se realizó un ajuste de la cantidad de levaduras a administrar con base en el peso de los ratones recién nacidos (1.5 g) y considerando a la cantidad de levaduras utilizada en los ratones adultos ( $1 \times 10^6$  levaduras). De manera que la cantidad de levaduras administrar en los ratones Rn es de  $1 \times 10^5$  levaduras en 30  $\mu$ L, misma que está ajustada al peso del ratón recién nacido, además se decidió utilizar 3 concentraciones por encima de la que corresponde al peso del ratón Rn, las cuales fueron:  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  UFCs de *C. albicans* en 30  $\mu$ L.

En todo momento se manipulará el microorganismo bajo las normas establecidas en el Manual de Procedimientos, Seguridad y Bioseguridad del Laboratorio de Microbiología Experimental LME-MPSBS-997-MAN.

#### 2.4. Modelo de infección sistémica con *C. albicans*

Para realizar la infección sistémica en los ratones Rn, se siguió la metodología de la técnica de administración intravenosa reportada por

*Kienstra et al.* (87), Los ratones Rn menores de 24 horas de vida se les administró *C. albicans* intravenosamente a través de la vena yugular. Mientras que en los ratones adultos la infección sistémica se indujo administrando a través de la vena caudal.

## 2.5. Curva de sobrevivencia

Para evaluar el efecto de sobrevida de cada concentración del hongo en el modelo experimental, se infectaron a los ratones adultos y recién nacidos vía intravenosa con las concentraciones previamente mencionadas y se monitorearon ambos grupos de animales hasta su muerte o hasta los días 40 post-infección en adultos y 6 post-infección en recién nacidos. Se registró el tiempo de muerte de los ratones, para posteriormente realizar las curvas de sobrevivencia mediante la curva de Kaplan-Meier *log-rank*.

En todos los experimentos realizados tanto para ratones adultos como para los ratones recién nacidos se contó con 2 grupos adicionales: grupo control y grupo control/vehículo. El grupo control consistió en animales que se mantuvieron en condiciones estándares de alojamiento y no se les administró ninguna solución ni algún microorganismo. El grupo control/vehículo consistió en animales que se les administró solución salina fisiológica (SSF) estéril y libre de pirógenos.

## 2.6. Obtención de órganos

Para el análisis de carga fúngica y las tinciones histológicas, se eligieron las siguientes concentraciones de infección:  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  UFCs en 30  $\mu$ L para ratones Rn y  $1 \times 10^6$  UFCs en 200  $\mu$ L para adultos jóvenes. De los animales infectados con *C. albicans*, así como los animales del grupo vehículo y control, se extrajeron asépticamente los siguientes órganos: riñón, bazo, hígado, cerebro y pulmón, a los días 1, 2, 3, 4 y 6 post-infección tanto Rn como en adultos infectados, con  $1 \times 10^5$  levaduras en 30  $\mu$ L y  $1 \times 10^6$  levaduras en 200  $\mu$ L respectivamente, mientras que los órganos anteriormente mencionados se obtuvieron de ratones Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs en 30  $\mu$ L a los días 1, 2, 3 y 4 post-infección, para realizar el análisis de carga fúngica y cortes histológicos.

## 2.7. Cuantificación de UFC

Los órganos obtenidos a los distintos días de análisis establecidos, se pesaron asépticamente y se maceraron mediante un homogenizador de vidrio agregando 1 mL de SSF estéril, los macerados se colocaron en micro tubos de 1.5 mL, a partir de los micro tubos se realizaron diluciones seriadas 1:10 y se sembró en placas de agar Mycosel por duplicado, 48 horas después de sembrarse se realizó el conteo de colonias. Para el cálculo final de UFC se tomó en cuenta el peso de la muestra macerada, los valores obtenidos se reportaron en UFC/g.

A continuación se describe el cálculo:

$$\text{UFC/g} = [(\text{UFC} \times \text{FD}) / (\text{FDS} \times \text{PO})]$$

En donde:

UFC/g= UFC por gramo de órgano cuantificado

UFC= Promedio del duplicado de la cuenta de colonias en la placa de agar

FD= Factor de dilución a la que se llevó a cabo el conteo

FDS= Factor de conversión del volumen de siembra

PO= Peso del órgano cuantificado en gramos

## 2.8. Análisis histológico

Los órganos de interés se obtuvieron a los días de análisis establecidos para los cortes histológicos de adultos y recién nacidos y se fijaron en una solución de formaldehído al 4% con PBS por un tiempo mínimo de 48 horas. Posteriormente se realizó la inclusión del tejido en bloques de parafina.

### 2.8.1. Inclusión y corte del tejido

La inclusión del tejido consistió en 3 etapas: Deshidratación, aclaramiento e inclusión en parafina, el protocolo de inclusión se describe a continuación.

Deshidratación. Una vez fijada la muestra, esta debe ser deshidratada como a continuación se menciona:

Etanol al 70%	12 horas
---------------	----------

Etanol al 70%	12 horas
---------------	----------

Etanol al 95%      1 hora

Etanol al 95%	1 hora
---------------	--------

Etanol al 100%      1 hora

Etanol al 100%	1 hora
----------------	--------

Aclaramiento. Ya deshidratada la muestra, se procedió a sumergirla en xilol, el cual es soluble con la parafina, como se menciona a continuación:

Etanol 100%- Xilol 100% (1:1)	1 hora
-------------------------------	--------

Xilol 100%	1 hora
------------	--------

Xilol 100%      1 hora

Inclusión en parafina. Posterior al aclaramiento se procedió a sumergir la muestra en parafina líquida (60°C).

Parafina	1 hora
----------	--------

Parafina	1 hora
----------	--------

Parafina      1 hora

Después de las 3 horas en parafina líquida, el tejido se colocó en un molde de metal para embeberlo en parafina, se dejó solidificar en la placa de enfriamiento, una vez solidificado, se retiró el molde y se almacenaron las muestras a -20°C.

Los bloques de parafina donde se encuentran los órganos, se cortaron en el micrótopo a 6 µm, las secciones obtenidas se colocaron en el baño de flotación, estas secciones se recuperaron del baño mediante portaobjetos.

### 2.8.2. Tinción de las laminillas

Para realizar la tinción de las laminillas obtenidas es necesario desparafinar el tejido.

Desparafinación: los portaobjetos con las secciones se introdujeron en xilol y una serie de soluciones alcohólicas.

Xilol 100%	10 minutos
Xilol 100%	10 minutos
Etanol 100%	10 minutos
Etanol 100%	10 minutos
Etanol 95%	10 minutos
Etanol 95%	10 minutos
Etanol 70%	10 minutos
Etanol 70%	10 minutos
Agua destilada	10 minutos

Los cortes se tiñeron por 2 técnicas: tinción de H-E y PAS.

### 2.8.3. Tinción con Hematoxilina-Eosina

Inmediatamente después de la desparafinación, y posterior a la rehidratación se siguieron los siguientes pasos:

Hematoxilina	4 minutos
Agua de grifo	30 segundos
Agua destilada	5 minutos

Eosina 1%	30 segundos
Agua destilada	30 segundos

Se deshidrata sumergiendo en secuencia la muestra en soluciones de etanol por 10 minutos en etanol al 70%, posteriormente etanol al 96% y por ultimo etanol absoluto.

Finalmente sumerge en xilol por 10 minutos 2 veces y se realiza el montaje con resina y se coloca un cubreobjetos a la preparación.

#### 2.8.4. Tinción con ácido periódico de schiff

Inmediatamente después de la desparafinacion, y posterior a la rehidratación se siguieron los siguientes pasos:

Ácido peryódico	5 minutos
Agua de grifo	30 segundos
Agua destilada	3 minutos
Reactivo de schiff	15 minutos
Agua de grifo	30 segundos
Agua destilada	3 minutos
Hematoxilina	2 minutos
Agua destilada	30 segundos

Se deshidrata sumergiendo en secuencia la muestra en soluciones de etanol por 10 minutos en etanol al 70%, posteriormente etanol al 96% y por ultimo etanol absoluto.

Finalmente sumerge en xilol por 10 minutos 2 veces y se realiza el montaje con resina y se coloca un cubreobjetos a la preparación.

## 2.9. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos pertinentes se realizaron en paquete estadístico GraphPad Prism 6.

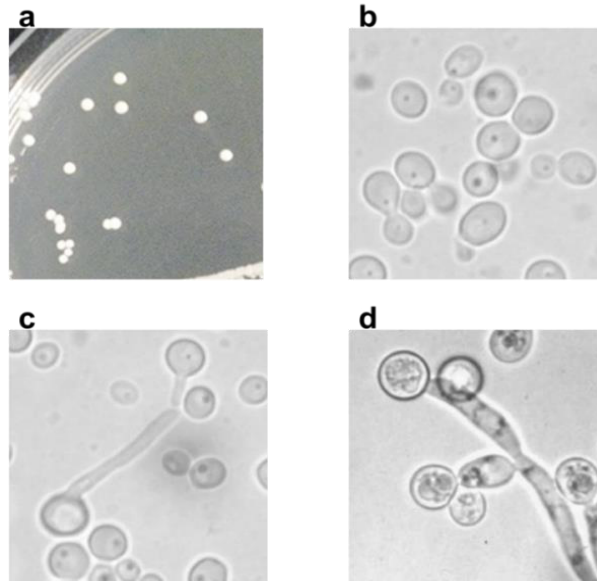


## CAPÍTULO 3

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Producción de tubo germinal y clamidosporas de la cepa ATCC de *C. albicans*

Con el objetivo de verificar la autenticidad de la cepa ATCC 66027 de *C. albicans* se realizó el análisis macro y microscópico, así como las pruebas de tubo germinal y clamidosporas de la cepa que se utilizó en este estudio. De un cultivo de 48 horas de incubación a 30 °C, en el análisis macroscópico se observaron colonias blancas, redondas, cremosas, lisas y limitadas (Figura 1a), mientras que en el análisis microscópico se observaron agrupaciones de células ovaladas y/o redondas (Figura 1b). Adicional a ello, se realizó la prueba de producción de tubo germinal, la cual fue positiva para la cepa en estudio observando la clásica extensión filamentosa de la levadura (Figura 1c). Finalmente se evaluó la producción de clamidosporas, siendo esta prueba positiva, observando clamidosporas con morfología redonda y de pared gruesa típicas de *C. albicans*, presentes en la pseudohifa (Figura 1d). Por lo que estos resultados comprueban que la cepa corresponde a *C. albicans*.

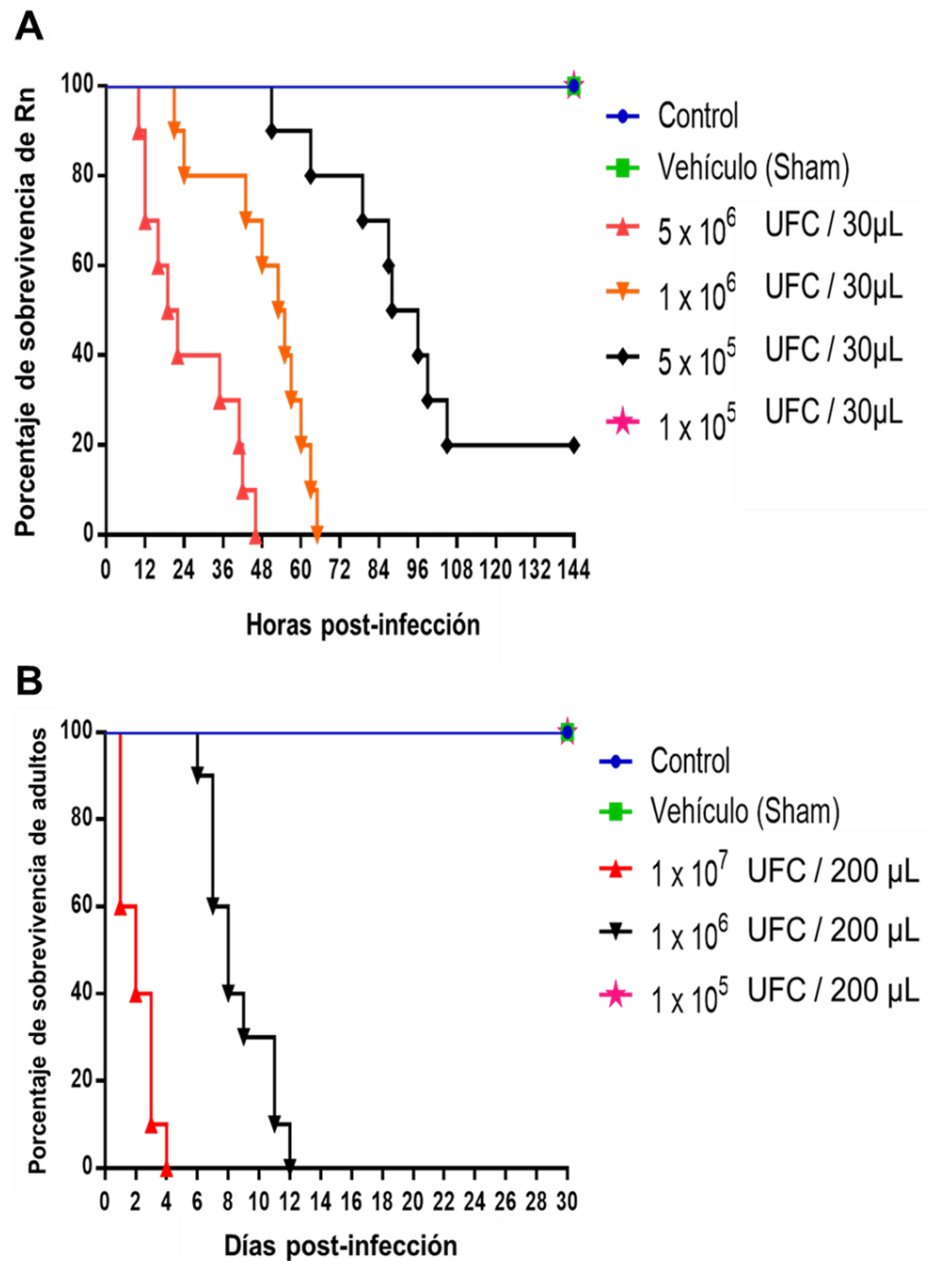


**Figura 1. Análisis macroscópico y microscópico de la cepa ATCC 66027 de *C. albicans*.** a) Colonias del hongo en agar Mycosel de 48 horas de incubación a 30 °C, b) Micrografía óptica de células levaduriformes provenientes del cultivo del hongo (100x). c) Micrografía óptica del tubo germinal positivo de *C. albicans* (100x). d) Micrografía óptica de clamidosporas de *C. albicans* (100x).

3.2. Los ratones recién nacidos mueren a tiempos más tempranos durante la candidosis sistémica en contraste a los adultos.

Con el objetivo de evaluar la sobrevivencia de ratones Rn (<24 horas de vida) infectados con distintas concentraciones del hongo durante la candidosis invasiva, ratones Rn fueron infectados vía intravenosa a través de la vena yugular externa con las siguientes cantidades:  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$  UFCs de *C. albicans* respectivamente. Por otro lado, ratones hembras (adultos) fueron inoculados sistémicamente a través de la vena caudal con  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  UFCs, con la finalidad de ser un punto de comparación con los animales Rn.

Demostramos que la mortalidad del 100% de los ratones Rn infectados con la cantidad de  $1 \times 10^6$  UFCs de *C. albicans* se observa aproximadamente al día 2.7 (65 horas) post-infección (Figura 2A). Mientras la mortalidad del 100% de los ratones adultos infectados con la misma cantidad de UFCs se alcanza al día 12 de infección (Figura 2B). El tiempo medio de sobrevivencia de ratones Rn infectados con  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^5$  UFCs fue de 2.3 y 3.8 días respectivamente, en contraste, con los adultos infectados con  $1 \times 10^6$  UFCs que fue de 8 días. Interesantemente cuando infectamos ratones Rn con la cantidad de levaduras que corresponde en peso a los animales Rn ( $1 \times 10^5$  UFCs), evidenciamos la sobrevivencia del 100% de los animales infectados a los 6 días (144 horas) post-infección (Figura 2A), aunque es importante señalar que, el 40% de los Rn presentaron menor tamaño y peso con respecto a los Rn del grupo control y vehículo (datos no mostrados). Estos resultados nos muestran que al igual que los ratones adultos, los recién nacidos presentan una mortalidad dependiente de la cantidad de levaduras inoculadas, sin embargo, la mortalidad de los animales recién nacidos ocurre a tiempos más tempranos de la infección utilizando cantidades similares o menores con respecto a los adultos. Interesantemente, los ratones Rn infectados con una cantidad de levaduras que corresponde al peso de los mismos no mueren dentro de la primera semana de infección.



**Figura 2.** La mortalidad de los ratones Rn fue dependiente de la concentración, e interesadamente los Rn no mueren al administrar una cantidad de UFCs ajustadas con respecto a su peso. **A)** Ratones Rn menores de 24 horas de vida y **B)** Animales adultos fueron infectados vía sistémica con distintas cantidades de *C. albicans*, En ambos grupos, la mortalidad fue dependiente de las UFCs del hongo. Se esquematiza el resultado representativo de 2 experimentos independientes (n=10 para cada

### 3.3. El hígado de los ratones Rn fue el órgano que permitió el desarrollo de mayor carga fúngica durante la candidosis invasiva.

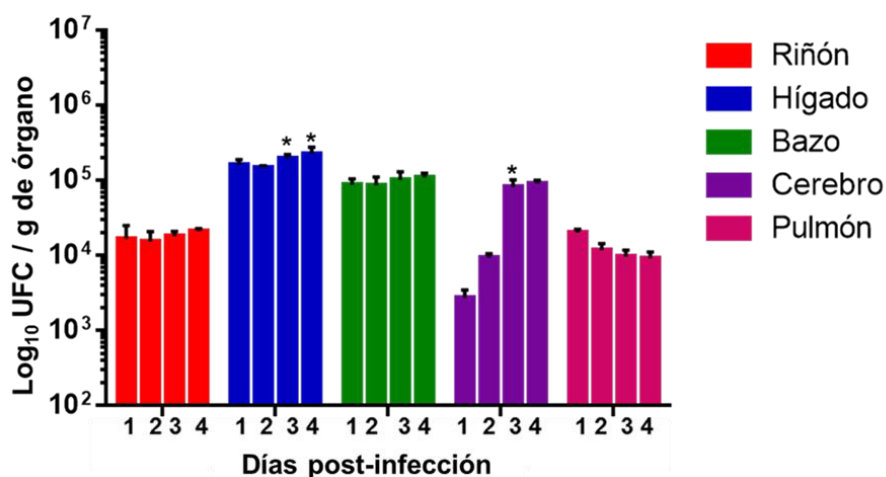
Previamente se ha reportado en modelos experimentales de candidosis invasiva en ratones adulto; el riñón es el tejido que aloja mayor UFCs en las candidemias y es una de las principales causas de muerte, nuestra hipótesis fue los animales Rn con candidosis invasiva tendrán el mismo comportamiento en la carga fúngica comparando con ratones adultos. Con el objetivo de evaluar la carga fúngica en los distintos órganos de diseminación durante esta afección, decidimos infectar ratones Rn con  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  UFCs y animales adultos con  $1 \times 10^6$  UFCs, con base a los tiempos de muerte de los mismos reportados en la curva de sobrevivencia. Una vez infectados los animales, estos fueron sacrificados a los días 1, 2, 3, 4 y 6 post-infección tanto Rn como en adultos infectados con  $1 \times 10^5$  UFCs y  $1 \times 10^6$  UFCs respectivamente, mientras los ratones Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs el sacrificio fue a los días 1, 2, 3 y 4 post-infección, para obtener riñón, bazo, hígado, cerebro y pulmón.

Al evaluar los resultados de las determinaciones de carga fúngica provenientes de los órganos de ratones Rn infectados con  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^5$  UFCs, observamos que el hígado fue el órgano que contenía mayor carga fúngica con respecto a los distintos órganos analizados ( $P < 0.05$ ). En seguida del hígado, el bazo y cerebro fueron los órganos con mayor UFCs con respecto al resto de los órganos analizados ( $P < 0.05$ ). Finalmente, riñón y pulmón fueron los que alojaron menor carga fúngica en ambos grupos de ratones Rn infectados (Figura 3A-B).

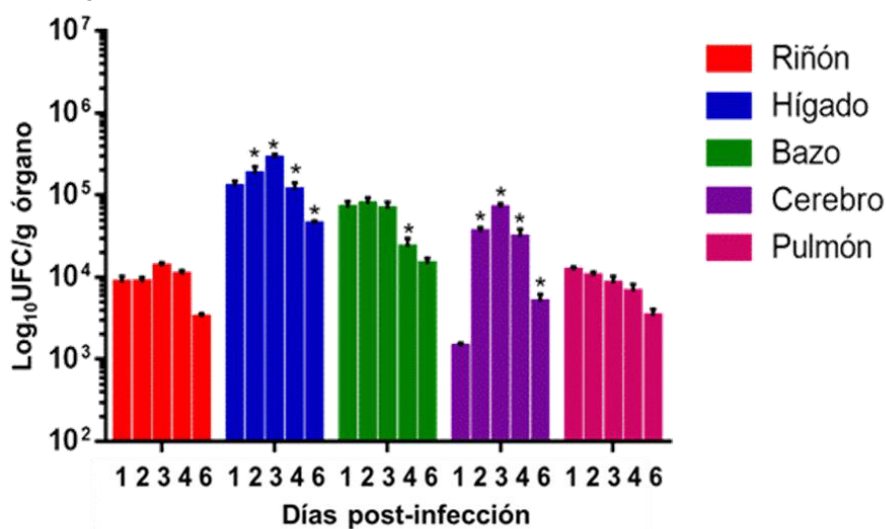
Por otra parte, al realizar el análisis de los resultados de las UFCs durante la cinética de infección de los distintos tejidos de Rn infectados con las cantidades de hongo previamente mencionadas, evidenciamos que la carga fúngica de los ratones Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs presentan incremento de la carga fúngica conforme pasaban los días de infección (Figura 3A), mientras que los Rn infectados con  $1 \times 10^5$  UFCs muestran una reducción de la misma a partir del día 4 de infección con respecto al día 3 (Figura 3B). En el cerebro y bazo demostramos que el comportamiento de la cinética de UFCs fue similar al del hígado para cada uno de los grupos de animales Rn infectados respectivamente (Figura 3A-B). En contraste a los resultados obtenidos de los Rn, el órgano que alojó y permitió el incremento drástico de las UFCs en los ratones adultos durante los días de infección fue el riñón ( $P < 0.05$ ), mientras que el resto de los tejidos analizados no presentaron diferencias en la carga fúngica entre ellos, así como también en el comportamiento de la cinética (Figura 3C). Interesantemente, nuestros resultados demuestran diferencias importantes en la carga fúngica de los distintos tejidos analizados entre Rn y adultos. El hígado de los animales Rn fue el órgano que alojó una mayor cantidad de UFCs y el riñón de los Rn evidenció menor carga fúngica durante la candidosis invasiva. En contraste a los ratones adultos donde el riñón es el tejido que contiene una mayor cantidad de UFCs. Importantemente, se evidenció que al administrar una cantidad de levaduras ajustada a los ratones Rn, estos muestran una reducción de las UFCs en los órganos afectados a partir del día 4 de infección lo que posiblemente favorece a la sobrevivencia de los animales Rn. Por lo que estos resultados demuestran que el comportamiento de la

carga fúngica entre órganos de animales Rn infectados con distintas cantidades es distinto, así como también al comparar con ratones adultos.

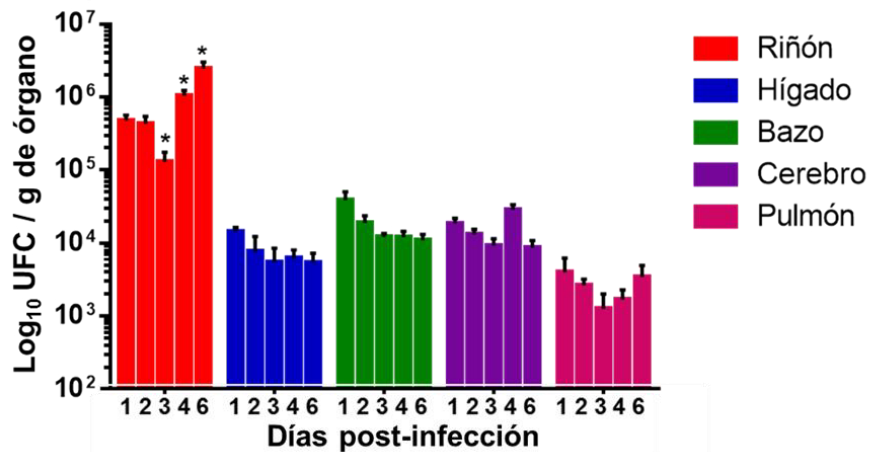
### A) Rn $5 \times 10^5$ UFC



### B) Rn $1 \times 10^5$ UFC



### C) Adultos $1 \times 10^6$ UFC



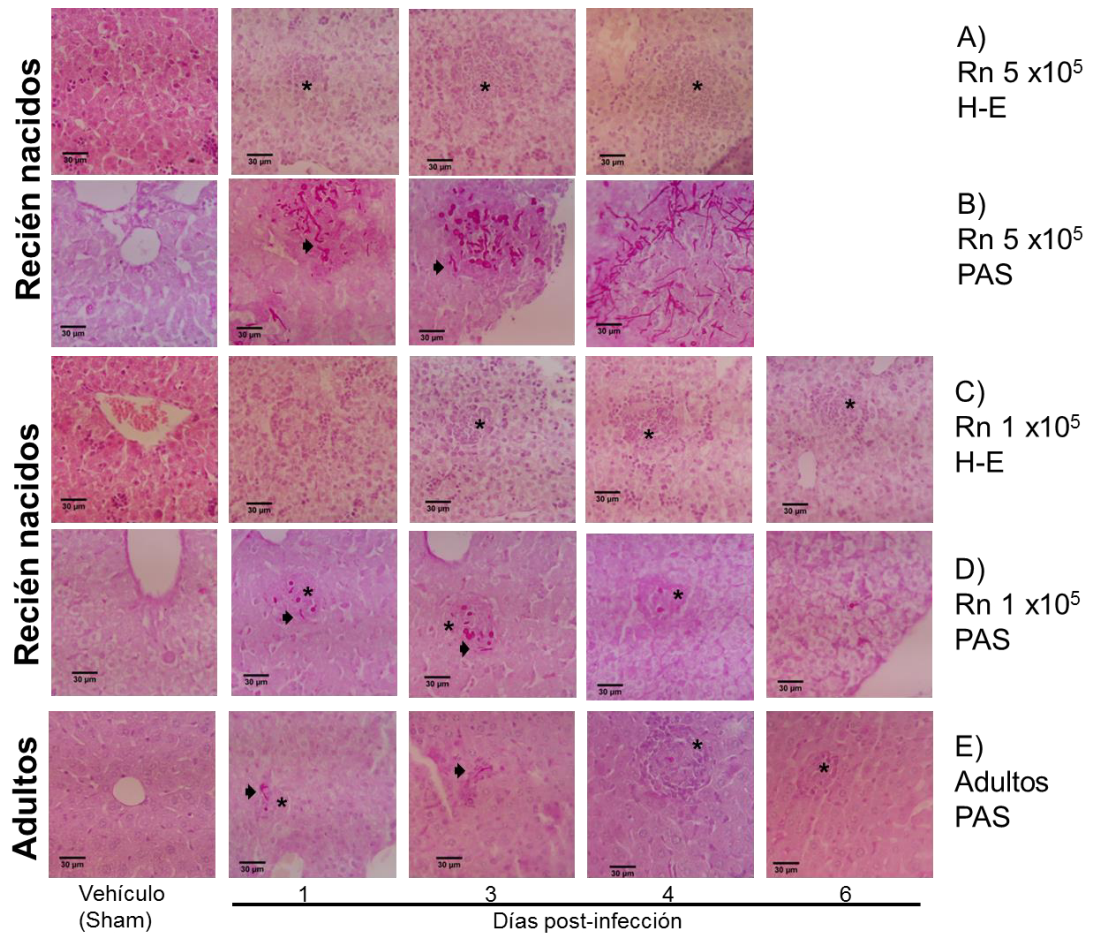
**Figura 3. El hígado de los ratones Rn presentéa mayor carga fúngica. Interesantemente, ajustando el inoculo administrar a los Rn evidenciamos una reducción de las UFCs en la mayoría de los tejidos, durante la candidosis invasiva. A)** Cinética de la carga fúngica de riñón, hígado, bazo, cerebro y pulmón a distintos días de infección de ratones Rn infectados vía sistémica con  $5 \times 10^5$  UFC de *C. albicans*. **B)** Cinética de las UFCs de Rn infectados con  $1 \times 10^5$  UFC y **C)** Cinética de las UFCs de ratones adultos. Se grafica la media  $\pm$  desviación estándar de las  $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$  órgano. Se muestra un resultado representativo de 2 experimentos independientes ( $n=7$  para cada grupo experimental). \*  $P<0.05$ , Two-way ANOVA.

#### 3.4. Determinación del daño histopatológico en los tejidos de diseminación en los ratones con candidosis invasiva.

Con el objetivo de evaluar el daño histopatológico en los órganos de invasión previamente analizados, se siguió la misma estrategia experimental utilizada para el análisis de carga fúngica de los distintos grupos de animales. Al evaluar los cortes histológicos del hígado de ambos grupos de Rn infectados (con  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^5$  UFCs respectivamente), observamos la invasión de levaduras y estructuras filamentosas de *C. albicans* en el parénquima hepático como se visualiza en la tinción de PAS (Figura 4B y D), acompañado de un infiltrado celular mixto de leve a moderado con un predominio de polimorfonucleares (PMN) asociado a la presencia de las estructuras fúngicas (Figura A y C), este infiltrado celular formaba posiblemente una estructura de contención de tipo granuloma limitando la invasión de los componentes fúngicos desde los primeros días de infección, por lo que será interesante caracterizar las poblaciones celulares que



conforman a esta posible estructura de contención. Por otro lado, el comportamiento de la invasión y el daño ocasionado por el hongo, así como el infiltrado celular en el tejido hepático fue distinto durante la cinética de infección en los Rn infectados (Tabla 1), evidenciamos que los animales Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFC presentan una invasión y daño en el tejido hepático de moderado a severo durante la infección, con la formación de abscesos durante los tiempos tardíos de la infección (Figura 4B y Tabla 1). En contraste a los animales Rn infectados con  $1 \times 10^5$  UFCs donde observamos una invasión de las estructuras del hongo leve a moderado, así como un menor proceso inflamatorio (infiltrado celular leve) durante los días de infección posiblemente al control de la invasión (Figura 4D y Tabla 1). Finalmente, el hígado de los animales adultos infectados, presentó una invasión muy leve de las estructuras fúngicas, al igual que el daño patológico que fue leve (Figura 4E y Tabla 1).



**Figura 4. El hígado de ratones Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs muestra una invasión y daño histopatológico severo, en comparación con la lesión tisular leve de Rn infectados con un inoculo ajustado a su peso.**

A) Tinción de H-E de secciones de hígado de ratones Rn vehículo e infectados con  $5 \times 10^5$  UFC. B) Tinción de PAS de secciones de hígado de ratones Rn vehículo e infectados con  $5 \times 10^5$  UFC. C) Tinción de H-E de secciones de hígado de ratones Rn vehículo e infectados con  $1 \times 10^5$  UFC. D) Tinción de PAS de secciones de hígado de ratones Rn vehículo e infectados con  $1 \times 10^5$  UFC. E) Tinción de PAS de secciones de hígado de ratones adultos vehículo e infectados. Ampliación original: 40x. Las flechas indican pseudohifas de *C. albicans*. Asterisco indica infiltrado celular.

**Tabla 1.** Análisis semi-cuantitativo del daño histopatológico del hígado de ratones BALB/c con candidosis diseminada durante los días de infección.

	Día 1 infección	Día 3 infección	Día 4 infección	Día 6 infección
<b>Ratones Rn 5x10<sup>5</sup></b>				
Lesión tisular	++	++	+++	-
Infiltrado celular	*	**	**	-
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	-
<b>Ratones Rn 1x10<sup>5</sup></b>				
Lesión tisular	++	++	+	+
Infiltrado celular	*	**	**	*
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	PMN
<b>Ratones adultos</b>				
Lesión tisular	+	+	+	+
Infiltrado celular	*	*	*	*
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	PMN

**Lesión tisular:** se clasificó con base a la cantidad de estructuras fúngicas y/o conglomerados de las mismas (Levaduras y filamentos), así como del daño observado por sección de tejido analizado.

+ Leve: 1-20 estructuras fúngicas, 1-3 conglomerados.

++ Moderado: 21- 50 estructuras fúngicas, 4-7 conglomerados.

+++ Severo: > 50 estructuras fúngicas, > 8 conglomerados.

**Infiltrado celular** se clasificó con base a la cantidad de leucocitos observados por sección de tejido.

\* Escaso

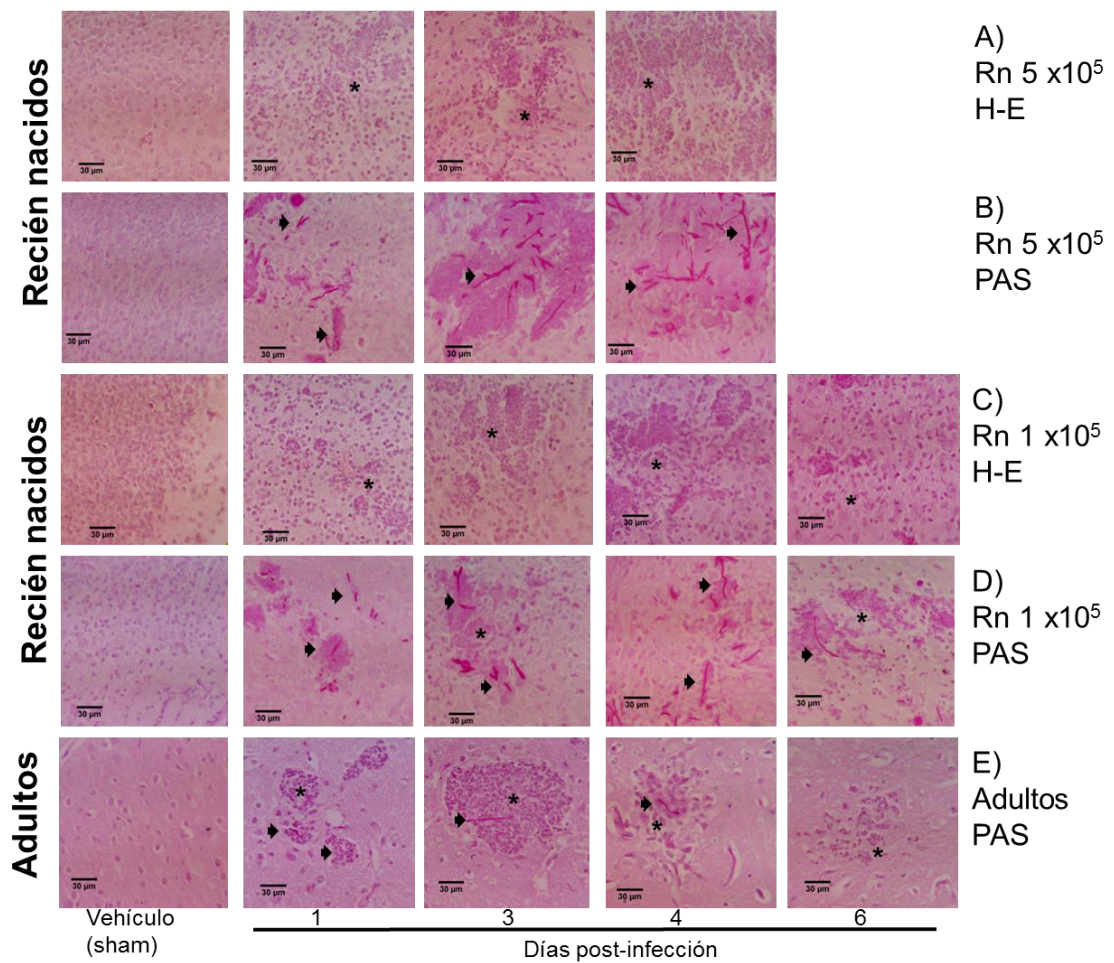
\*\* Moderado

\*\*\* Abundante

PMN Polimorfonucleares, MN Mononucleares, Mixto (MN y PMN), ND No Detectable.

Al igual que el hígado de los animales Rn, el cerebro de los Rn infectados con ambas cantidades de levaduras evidenciaron la invasión y daño patológico por las estructuras fúngicas principalmente en la corteza cerebral (sustancia gris) y poca invasión en la sustancia blanca durante la infección (Figura 5), Por otro lado, el comportamiento de la lesión tisular en este tejido fue distinto entre ambos grupos de Rn infectados durante los días de infección (Tabla 2). Debido a que los Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs

demonstraron una invasión del hongo principalmente de estructuras filamentosas e infiltrado celular alto respectivamente, aunado a una lesión tisular severa principalmente en la corteza cerebral durante los días post-infección (Figura 5A-B y Tabla 2), mientras que los animales Rn infectados con  $1 \times 10^5$  UFCs demostraron un posible control de la invasión de las estructuras del hongo en la corteza cerebral, debido a que la lesión tisular fue de moderada a leve, así como un menor proceso inflamatorio (infiltrado celular leve) durante la cinética infección (Figura 5C-D y Tabla 2). En contraste al cerebro de los animales Rn, el cerebro de los animales adultos infectados, mostraron una invasión leve de las estructuras fúngicas principalmente de hifas de *C. albicans* en la corteza cerebral, al igual que el daño patológico que fue leve durante los días post-infección (Figura 5E y Tabla 2).



**Figura 5. El cerebro de los animales Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs presenta una invasión y daño histopatológico severo, en comparación con la lesión tisular leve de Rn infectados con un inoculo ajustado a su peso.** A) Tinción de H-E de secciones de cerebro de ratones Rn vehículo e infectados con  $5 \times 10^5$  UFC. B) Tinción de PAS de secciones de cerebro de ratones Rn vehículo e infectados con  $5 \times 10^5$  UFC. C) Tinción de H-E de secciones de cerebro de ratones Rn vehículo e infectados con  $1 \times 10^5$  UFC. D) Tinción de PAS de secciones de cerebro de ratones Rn vehículo e infectados con  $1 \times 10^5$  UFC. E) Tinción de PAS de secciones de cerebro de ratones adultos vehículo e infectados. Ampliación original: 40x. Las flechas indican pseudohifas de *C. albicans*. Asterisco indica infiltrado celular.

**Tabla 2.** Análisis semi-cuantitativo del daño histopatológico del cerebro de ratones BALB/c con candidosis diseminada durante los días de infección.

	Día 1 infección	Día 3 infección	Día 4 infección	Día 6 infección
<b>Ratones Rn 5x10<sup>5</sup></b>				
Lesión tisular	+	++	+++	-
Infiltrado celular	*	**	**	-
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	-
<b>Ratones Rn 1x10<sup>5</sup></b>				
Lesión tisular	+	++	++	+
Infiltrado celular	*	**	**	*
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	PMN
<b>Ratones adultos</b>				
Lesión tisular	++	+	+	+
Infiltrado celular	**	**	**	*
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	PMN

**Lesión tisular** se clasificó con base a la cantidad de estructuras fúngicas y/o conglomerados de las mismas (Levaduras y filamentos), así como del daño observado por sección de tejido analizado.

+ Leve: 1-20 estructuras fúngicas, 1-3 conglomerados.

++ Moderado: 21- 50 estructuras fúngicas, 4-7 conglomerados.

+++ Severo: > 50 estructuras fúngicas, > 8 conglomerados.

**Infiltrado celular** se clasificó con base a la cantidad de leucocitos observados por sección de tejido.

\* Escaso

\*\* Moderado

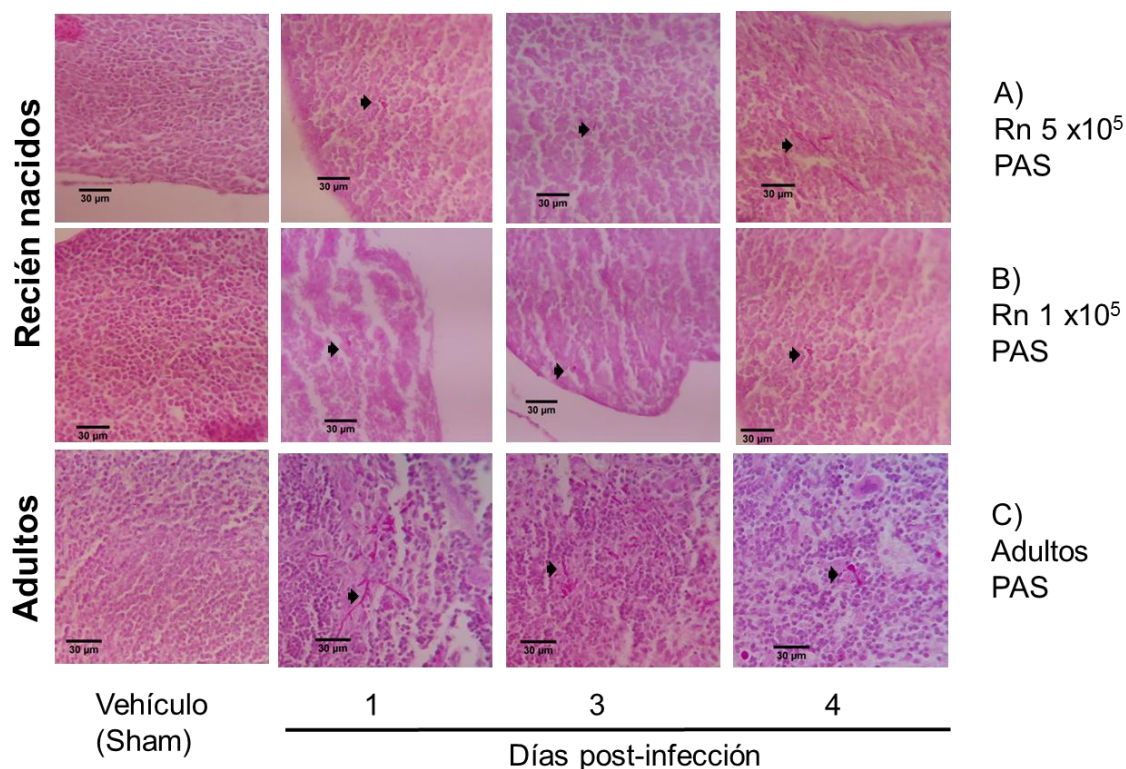
\*\*\* Abundante

PMN Polimorfonucleares, MN Mononucleares, Mixto (MN y PMN), ND No Detectable.

Interesantemente, el bazo de los animales Rn infectados con ambas cantidades de UFCs fue uno de los órganos que contenía una alta carga fúngica durante la cinética de infección, sin embargo, Al evaluar los cortes histológicos de este tejido se evidencio una invasión leve de levaduras e hifas de *C. albicans* en ambos grupos de infección (Figura 6 y Tabla 3), así como un daño leve en el tejido y bajo infiltrado celular. Los resultados del



bazo de los Rn infectados fue similar al de los adultos infectados (Figura 6C y Tabla 3) presentando una invasión baja y un daño leve durante la infección.



**Figura 6. El bazo de animales Rn y adultos muestra una lesión tisular leve durante la cinética de infección, a pesar de tener una elevada carga fúngica.** A) Tinción de PAS de secciones de bazo de ratones Rn vehículo e infectados con  $5 \times 10^5$  UFC. B) Tinción de PAS de secciones de bazo de ratones Rn vehículo e infectados con  $1 \times 10^5$  UFC. C) Tinción de PAS de secciones de bazo de ratones adultos vehículo e infectados. Ampliación original: 40x. Las flechas indican pseudohifas de *C. albicans*. Asterisco indica infiltrado celular.

**Tabla 3.** Análisis semi-cuantitativo del daño histopatológico del bazo de ratones BALB/c con candidosis diseminada durante los días de infección.

	Día 1 infección	Día 3 infección	Día 4 infección	Día 6 infección
<b>Ratones Rn 5x10<sup>5</sup></b>				
Lesión tisular	+	+	+	-
Infiltrado celular	*	*	*	-
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	-
<b>Ratones Rn 1x10<sup>5</sup></b>				
Lesión tisular	+	+	+	ND
Infiltrado celular	*	*	*	ND
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	ND
<b>Ratones adultos</b>				
Lesión tisular	+	+	+	ND
Infiltrado celular	*	*	*	ND
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	ND

**Lesión tisular** se clasificó con base a la cantidad de estructuras fúngicas y/o conglomerados de las mismas (Levaduras y filamentos), así como del daño observado por sección de tejido analizado.

+ Leve: 1-20 estructuras fúngicas, 1-3 conglomerados.

++ Moderado: 21- 50 estructuras fúngicas, 4-7 conglomerados.

+++ Severo: > 50 estructuras fúngicas, > 8 conglomerados.

**Infiltrado celular** se clasificó con base a la cantidad de leucocitos observados por sección de tejido.

\* Escaso

\*\* Moderado

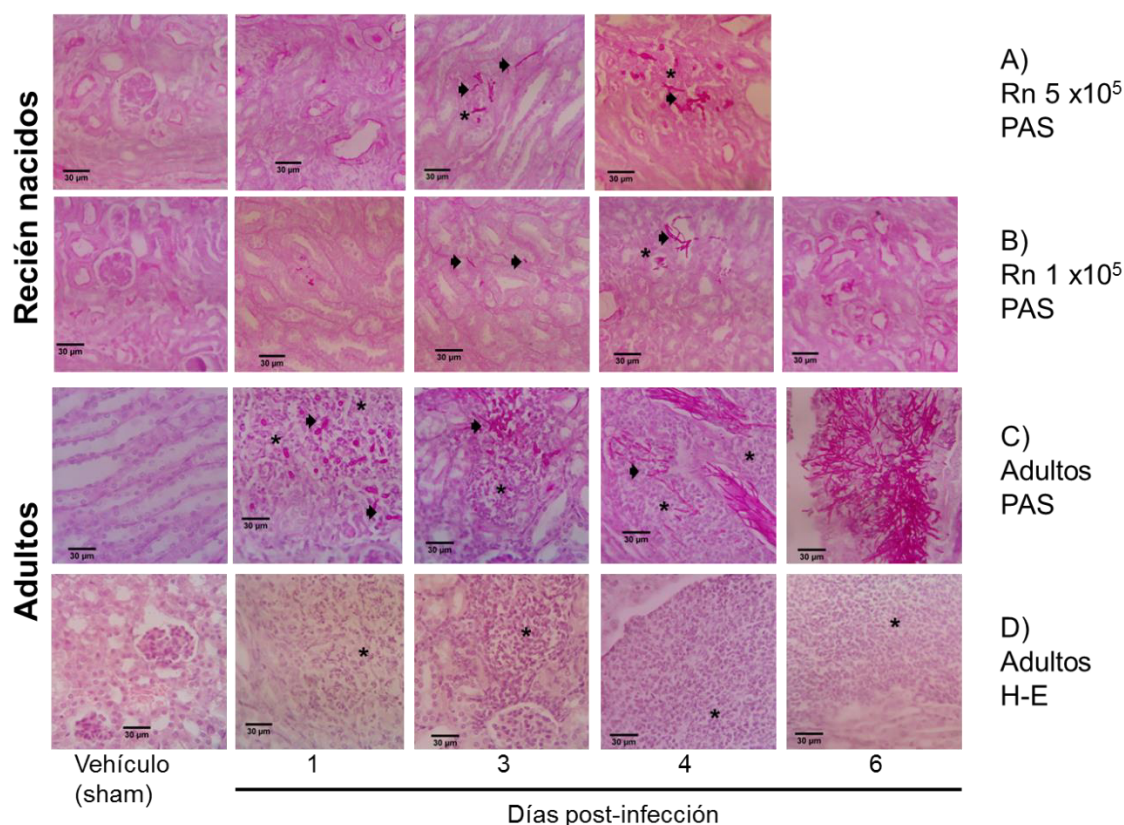
\*\*\* Abundante

PMN Polimorfonucleares, MN Mononucleares, Mixto (MN y PMN), ND No Detectable.

En cuanto al análisis histopatológico del riñón de ambos grupos de animales Rn infectados, demostramos que este tejido presenta una lesión tisular leve, debido que observamos una invasión leve en corteza y medula renal por levaduras y estructuras filamentosas de *C. albicans* en ambos grupos de ratones infectados durante los días post-infección (Figura 7A-B, Tabla 4). Haciendo una comparación entre los ratones Rn con respecto a los adultos, observamos que el riñón de los ratones adultos permite una invasión severa



durante la infección, la cual comienza con una invasión moderada principalmente en corteza y medula renal por levaduras y filamentos afectando al glomérulo y túbulos proximales como distales, acompañado de un infiltrado celular moderado debido a las estructuras fúngicas durante los primeros tres días de infección (Figura 7 C-D y Tabla 4). A partir del día 4 post-infección la invasión de las estructuras fúngicas se extendió hasta la medula, pelvis y papila renal, acompañado de una acumulación masiva de infiltrado celular.



**Figura 7. El riñón de animales Rn infectados presenta una invasión tisular leve por las estructuras fúngicas, en contraste a los adultos donde la lesión tisular es severa durante la candidosis invasiva** A) Tinción de PAS de secciones de riñón de ratones Rn vehículo e infectados con  $5 \times 10^5$  UFC. B) Tinción de PAS de secciones de riñón de ratones Rn vehículo e infectados con  $1 \times 10^5$  UFC. C) Tinción de PAS de secciones de riñón de ratones adultos vehículo e infectados con  $1 \times 10^6$  UFC. D) Tinción de H-E de secciones de riñón de ratones adultos vehículo e infectados con  $1 \times 10^6$  UFC. Ampliación original: 40x. Las flechas indican pseudohifas de *C. albicans*. Asterisco indica infiltrado celular.

**Tabla 4.** Análisis semi-cuantitativo del daño histopatológico del riñón de ratones BALB/c con candidosis diseminada durante los días de infección.

	Día 1 infección	Día 3 infección	Día 4 infección	Día 6 infección
<b>Ratones Rn 5x10<sup>5</sup></b>				
Lesión tisular	+	+	+	-
Infiltrado celular	*	*	*	-
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	-
<b>Ratones Rn 1x10<sup>5</sup></b>				
Lesión tisular	+	+	+	+
Infiltrado celular	*	*	*	*
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	PMN
<b>Ratones adultos</b>				
Lesión tisular	++	++	+++	+++
Infiltrado celular	**	**	***	***
Predominio de células	PMN	PMN	PMN	PMN

**Lesión tisular** se clasificó con base a la cantidad de estructuras fúngicas y/o conglomerados de las mismas (Levaduras y filamentos), así como del daño observado por sección de tejido analizado.

+ Leve: 1-20 estructuras fúngicas, 1-3 conglomerados.

++ Moderado: 21- 50 estructuras fúngicas, 4-7 conglomerados.

+++ Severo: > 50 estructuras fúngicas, > 8 conglomerados.

**Infiltrado celular** se clasificó con base a la cantidad de leucocitos observados por sección de tejido.

\* Escaso

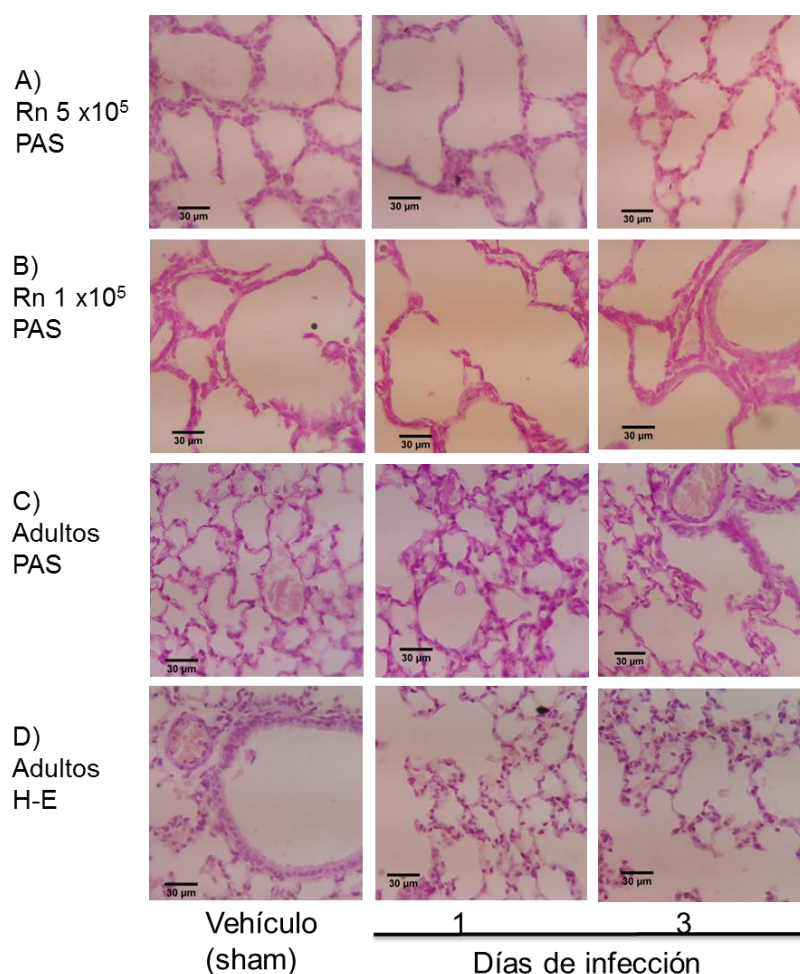
\*\* Moderado

\*\*\* Abundante

PMN Polimorfonucleares, MN Mononucleares, Mixto (MN y PMN), ND No Detectable.

Finalmente, al evaluar los cortes histológicos de pulmón de animales Rn y adultos infectados, no se observó la presencia de estructuras fúngicas, así como infiltrado celular en el tejido (Figura 8). Estos resultados demostraron diferencias importantes en la lesión tisular ocasionada por *C. albicans* en los distintos tejidos analizados entre los Rn y adultos con candidosis sistémica. El hígado y cerebro son los órganos que evidenciaron mayor daño

histológico en los animales Rn, mientras que los ratones adultos es el riñón es el tejido con mayor lesión tisular. Interesantemente se evidencio que al ajustar la cantidad de UFCs administrar a los ratones Rn, estos muestran un posible control de la invasión del hongo en los órganos afectados a partir del día 4 de infección. Aunado a ello se demostró que el comportamiento del daño histopatológico entre órganos de animales Rn infectados con distintas cantidades es distinto, así como también al comparar con ratones adultos.



**Figura 8. No evidenciamos la presencia de estructuras fúngicas en el pulmón de ratones Rn y adultos infectados.** A) Tinción de PAS de secciones de pulmón de ratones Rn vehículo e infectados con  $5 \times 10^5$  UFC. B) Tinción de PAS de secciones de pulmón de ratones Rn vehículo e infectados con  $1 \times 10^5$  UFC. C) Tinción de PAS de secciones de pulmón de ratones adultos vehículo e infectados. D) Tinción de H-E de secciones de pulmón de ratones adultos vehículo e infectados. Ampliación original: 40x.

## **CAPÍTULO 4**

### **4. DISCUSIÓN**

En el presente trabajo hemos establecido un modelo murino de candidosis invasiva neonatal utilizando ratones menores de 24 horas de vida, además mostramos que la mortalidad de los animales Rn es dependiente de concentración de hongo a administrar, y aunado a ello evidenciamos la diseminación del hongo a diferentes tejidos, siendo el hígado y el cerebro los órganos mayormente afectados debido al continuo aumento de la carga fúngica durante los días post-infección en ambos tejidos, así como una invasión y daño histopatológico de moderado a severo durante la infección. Por otro lado e interesantemente, al infectar ratones Rn con una concentración de hongo ajustada con base al peso de los mismos, demostramos que los animales pueden controlar la invasión y lesión tisular de las estructuras fúngicas en algunos órganos analizados, además observamos la reducción de la carga fúngica conforme pasan los días de infección en al menos 3 tejidos de los analizados, estos resultados nos indican que los Rn posiblemente son capaces de controlar la infección, lo que permite su sobrevivencia por lo menos 1 semana post-infección, debido que fue el tiempo hasta el cual se realizó el análisis.

Los modelos experimentales de ratones adultos han sido ampliamente utilizados para entender la patogénesis, la respuesta inmune, los factores de

virulencia, el curso de la enfermedad y la terapia durante la candidosis diseminada (78), sin embargo, es muy poco lo que se sabe de cada una de estas características durante la candidosis diseminada neonatal y aún menos en la afección desarrollada en los recién nacidos prematuros. Al analizar los resultados obtenidos de la curva de sobrevivencia de los animales Rn y adultos infectados con *C. albicans* intravenosamente, hemos observado que la mortalidad de ambos grupos de animales (Rn y adultos) es dependiente de la cantidad de levaduras administradas, nuestros resultados son similares a lo que previamente reportaron: Kronforst et al. al infectar ratones neonatos vía sistémica con *S. epidermidis* (88), Tsai et al. al inocular animales Rn vía intraperitoneal (i.p.) con *C. albicans* (86), Zhao et al. al administrar LPS bacteriano a ratones neonatos vía i.p. (89), y finalmente Netea et al. (84) y Chong et al. (90) al infectar ratones adultos vía sistémica con *C. albicans* demostraron que la mortalidad de los animales tanto Rn como adultos es dependiente de la concentración. Aunado a ello es importante considerar que los tiempos de mortalidad pueden variar de acuerdo a la vía de administración del antígeno o microorganismo, la cantidad o concentración del mismo, así como la edad de los ratones. En nuestros resultados de sobrevivencia, los animales Rn infectados con  $1 \times 10^6$  UFCs presentaron una mortalidad del 100% a las 65 horas de infección, en contraste a lo que Tsai et al. reportó al infectar ratones Rn vía i.p. con *C. albicans* con la misma cantidad de levaduras, los cuales presentaron una mortalidad del 10% a las 60 horas de infección (86), esto posiblemente se debe a la vía de inoculación, ya que nuestro modelo implica la administración directa del hongo a torrente sanguíneo con una diseminación

más rápida a tejidos. Además de la vía de infección, se ha demostrado que la mortalidad a diversos estímulos depende de la edad, en nuestro estudio evidenciamos que ratones Rn infectados con  $1 \times 10^6$  UFCs mueren a tiempos más tempranos de la infección en comparación con los ratones adultos infectados con la misma cantidad de levaduras. Estos resultados son similares a los que previamente reportó Zhao et al. al administrar LPS bacteriano a ratones de distintas edades observo que la mortalidad a una misma concentración de LPS bacteriano es dependiente de la edad (89). Interesantemente demostramos que ajustando la cantidad de levaduras a administrar a los ratones Rn con base en su peso, estos no mueren durante la primera semana de infección.

Por otro lado, al evaluar los resultados de la carga fúngica de los distintos sitios de diseminación durante la candidosis invasiva en ratones Rn y adultos, observamos que el hígado fue el órgano con mayor carga fúngica, seguido de cerebro y bazo en ambos grupos de ratones Rn infectados con distintas cantidades de levaduras ( $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$ ), Mientras que en los animales adultos infectados el riñón fue el principal órgano afectado, ha sido ampliamente reportado que el riñón de ratones adultos con candidosis diseminada es el órgano con mayor UFCs, así como mayor daño histopatológico (77,91,92). Por lo que estas diferencias drásticas entre Rn y adultos puede deberse múltiples factores, como por ejemplo, se ha descrito previamente que los Rn prematuros humanos presentan un sistema circulatorio en proceso de desarrollo y maduración provocando que la distribución sanguínea a tejidos sea distinta al de los adultos humanos,

además se ha descrito que durante el tercer trimestre de gestación del feto, el cerebro es el órgano que presenta mayor flujo sanguíneo, seguido del hígado fetal, mientras órganos como riñón y pulmón presentan menor flujo sanguíneo, este reducido flujo sanguíneo en el riñón se debe a que durante las últimas semanas de gestación el desarrollo de este tejido aun continua y el tamaño o volumen del tejido es menor al de los infantes, además este tejido presenta una reducida ultrafiltración durante los primeros días de vida (93–95), sin embargo estos estudios se han realizado en Rn humanos y no se conoce a detalle el sistema circulatorio y flujo sanguíneo en ratones Rn.

Al analizar el comportamiento de la carga fúngica durante los distintos días de infección en los órganos analizados de los 2 grupos de ratones Rn infectados, observamos diferencias importantes ya que la mayoría de los tejidos de los animales Rn infectados con  $5 \times 10^5$  UFCs presentaban un aumento de la carga fúngica durante los días de infección, interesantemente los mismos tejidos en los animales Rn infectados con la cantidad de levaduras ajustadas con base en el peso a los mismos presentaron una reducción de la carga fúngica a días tardíos de la infección. Previamente se ha reportado que ajustando la cantidad de estímulo o microorganismos a administrar en ratones Rn, estos pueden responder como los animales adultos, Sarzotti et al. demostró que ajustando la cantidad de virus de la leucemia murina a administrar a ratones neonatos con base a la celularidad del bazo, estos pueden responder adecuadamente al estímulo como los ratones adultos (96). Como se observó en nuestros resultados de UFCs de los tejidos de ratones Rn infectados con una cantidad ajustada con base en

su peso, presentado una reducción de la UFCs en los tejidos.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio difiere de lo que previamente Pope y cols observaron al administrar levaduras de *C. albicans* por vía oral en animales de 5-6 días de vida con la intención de lograr diseminación como complicación de la invasión intestinal donde el hígado fue el órgano que presenta mayor carga fúngica con respecto a riñón y bazo mientras que el cerebro no presentó invasión, este resultado fue similar a lo encontrado en nuestro estudio en cuanto al hígado, sin embargo la carga fúngica fue aproximadamente 2-3 unidades Log mayores en nuestro estudio (85), y de lo que reporto Tsai et al. al infectar por vía i.p. ratones de 2 días de vida con *C. albicans* con el objetivo de permitir la invasión del hongo a distintos tejidos como fue el riñón que presentó mayor carga fúngica con respecto al pulmón e interesantemente el cerebro no presento invasión del hongo (86). En buena medida atribuimos estas diferencias a que nosotros decidimos emplear ratones Rn menores de 24 horas de vida quienes de acuerdo a la literatura son equiparables a evaluar a recién nacidos prematuros humanos, ya que en estudios previos se ha descrito que los ratones Rn (1-5 días de vida) representan el tercer trimestre de gestación humano, en el que aún se encuentra en desarrollo el cerebro, pulmón, riñón, bazo y el sistema inmune, mientras que los ratones mayores de 7 días de vida son comparables a Rn humanos a término (58,97–100). Y a que adicionalmente acordamos administrar por vía intravenosa las levaduras de *C. albicans* utilizando la técnica del modelo murino neonatal de sepsis bacteriana por *S. epidermidis* establecido por *Kronforst et al.*(88), lo que nos permitió emular la



introducción del hongo a través de un catéter central venoso como los utilizados durante la alimentación parenteral y administración de medicamentos en humanos prematuros (101,102).

Muchos de los cambios estructurales que ocurren en los tejidos durante la vida posnatal de los roedores son consistentes con los observados durante el último periodo prenatal en los humanos. Por ejemplo, el cerebro de Rn prematuros humanos presenta un menor tamaño y volumen, así como una reducida sustancia gris y blanca en comparación con Rn a término y adultos humanos, estas diferencias se asocian a que durante este último periodo de gestación el cerebro presenta un crecimiento en la división celular, axonal, dendrítico y además la gliogénesis está en curso y comienza la sinaptogénesis (100,103–106). Como lo observado en nuestro estudio, ya que al hacer un análisis macroscópico del cerebro de ratones Rn, este tejido es de menor tamaño y peso con respecto al cerebro de los ratones adultos (datos no mostrados), además en el análisis histológico del cerebro de ratones Rn de los grupos experimentales (control, vehículo e infectados) la sustancia gris presenta una gran cantidad de células gliales en comparación con los adultos, posiblemente debido a la gliogénesis y al desarrollo estructural del cerebro.

Al igual que el cerebro, el riñón del Rn prematuro humano se encuentra en proceso de formación y desarrollo, ya que se ha descrito que el número de nefronas en los Rn prematuros es menor en comparación a los infantes, debido a que la nefrogénesis continua hasta la semana 36 de gestación, al

igual que la glomerulogénesis que continua hasta después del nacimiento, ambos procesos implican una compleja integración temporal y espacial de múltiples tipos de células que se encuentran en proliferación, diferenciación y migración para adquirir el tamaño y estructura normal del riñón (95,98,107). Similar a los resultados observados en los cortes histológicos de riñón de ratones Rn en nuestro estudio, donde se observaron glomérulos en proceso de desarrollo y formación, al igual que los túbulos renales. El pulmón es otro de los órganos en proceso de desarrollo y maduración en el Rn prematuro y roedor Rn, se ha descrito que la etapa de alveolarización comienza en el último trimestre de gestación y continua por lo menos unos años después del nacimiento (97). Tal como lo observado al realizar el análisis de las secciones histológicas de los pulmones de los ratones Rn de nuestro proyecto, evidenciando que este tejido se encuentra en la etapa de alveolarización. Finalmente en los roedores, la masa hepática aumenta varias veces en las primeras semanas postnatales debido a la hepatogénesis, hasta que se produce una fuerte disminución de la proliferación de los hepatocitos en la cuarta semana de vida (108,109). Estos resultados fueron similares al análisis histológico del hígado de los ratones Rn donde se observó una marcada división celular de los hepatocitos.

Al evaluar las secciones histológicas de los órganos de diseminación durante la candidosis invasiva en animales Rn, observamos la invasión del hongo en el parénquima hepático por conglomerados de levaduras e hifas de *C. albicans*, estos conglomerados se encontraban focalizados y acompañados de infiltrado celular lo que parecía limitar la invasión en el tejido, esto nos

hace pensar que posiblemente sean estructuras de contención que limitan y controlan la infección, tal como se observó en los Rn infectados con la concentración ajustada a su peso. Orbe y cols describen al granuloma como una estructura de contención caracterizada por un área pequeña de inflamación o de respuesta celular en los tejidos, como resultado de una infección microbiana, se producen con mayor frecuencia en los pulmones, pero pueden ocurrir en otros sitios del cuerpo, dichas estructuras tienen como función contener y controlar la invasión del patógeno (110). Mientras que el hígado de los ratones adultos infectados observamos una invasión leve de levaduras en el parénquima hepático, así como las posibles estructuras de contención y el control de la invasión para los días tardíos de la infección. Murphy et al. demostraron que al infectaron ratones adultos con *C. albicans* intravenosamente, la presencia de neutrófilos y macrófagos es importante durante los días de infección para el control de la invasión del hongo y evitar la aparición de filamentos, además no fue evidente la formación de abscesos tisulares y la formación de granulomas (91).

Por otro lado, al realizar el análisis histopatológico del cerebro de ratones Rn con candidosis diseminada, evidenciamos la invasión en la sustancia gris y sustancia blanca del cerebro por las estructuras fúngicas principalmente por hifas y pseudohifas del hongo en ambos grupos de ratones Rn infectados, sin embargo, en los animales Rn infectados con la concentración ajustada a ellos estos presentaron un control del daño e invasión del hongo durante la infección, así como la reducción de la carga fúngica en cerebro e hígado durante los días posteriores a la infección, lo que favorece a la sobrevivencia

de los animales Rn durante la candidosis. Nuestros resultados son similares a los que previamente reportaron Sarzotti y cols. al ajustar la cantidad de virus de la leucemia murina a inocular a ratones neonatos con base a la celularidad de los animales, los linfocitos T citotóxicos (CTL) de estos animales pueden responder funcionalmente contra el virus, similar como lo harían los CTL de los ratones adultos (96). Mientras que la invasión de sustancia gris y blanca por el hongo en el cerebro de ratones adultos en nuestro estudio fue limitada y controlada para los días posteriores de la infección, sin la presencia de lesiones tisulares importantes durante la infección, nuestros resultados son similares a estudios previos en los que han mostrado que la invasión del hongo en el cerebro es controlado y limitado, además el proceso inflamatorio no es progresivo ni destructivo, debido a la función que tienen las células mononucleares principalmente las células de la microglia durante la candidosis invasiva (91), además Ngo et al. reportó que los monocitos inflamatorios son esenciales en las primeras 48 horas post-infección para el control del hongo en el cerebro (92). Por lo que esto resultados nos llevan a la siguiente hipótesis: Ajustando la cantidad adecuada de levaduras a administrar a los animales Rn, las distintas poblaciones de su sistema inmune pueden responder contra el hongo para resolver la infección en los tejidos de diseminación y permitir la sobrevivencia de los animales. Esto debido a que previamente se reportado que la respuesta inmune celular que se establece en la mayoría de los tejidos de ratones adultos con candidemia es importante para controlar la invasión y finalmente resolver la infección.

Al analizar la histopatología del riñón de los Rn con candidosis invasiva, observamos una invasión baja y lesión tisular leve en corteza y medula renal por las estructuras fúngicas, sin el compromiso o daño de los glomérulos y túbulos renales en ambos grupos de ratones Rn infectados, esto resultados en el riñón de los neonatos posiblemente se deba al escaso flujo sanguíneo o baja perfusión sanguínea en este tejido durante los primeros días de vida lo que provoca una mínima diseminación a este tejido. En contraste a los resultados obtenidos en el riñón de los Rn, nosotros evidenciamos que el riñón de los animales adultos infectados es el órgano mayormente afectado presentando una lesión tisular de moderado a severa acompañada de abundante infiltrado celular comprometiendo la integridad de las estructuras renales, lo que posiblemente la falla o insuficiencia de la función de este tejido sea la causa de muerte de los animales adultos con candidosis invasiva, similar a lo que previamente Spellberg et al. reportó al infectar vía sistémica a ratones adultos con *C. albicans*, demostrando que riñón es el principal órgano afectado durante esta afección e incluso conduce a la insuficiencia renal como una manifestación patofisiológica primaria en las candidemias (77), por otro lado, Murphy y cols. demostraron que la estructuras filamentosas de *C. albicans* aparecen desde el primer día de infección en corteza renal y el número de hifas continua en incrementó lo que permite su invasión hasta túbulos y pelvis renal días tardíos de la infección, además se observaron la co-localización del hongo con leucocitos formando abscesos durante todos los tiempos de análisis, debido a la progresiva respuesta inflamatoria en este tejido (91). Mientras Ngo et al. en un modelo murino de candidosis invasiva en ratones adultos, determinaron

que neutrófilos y monocitos son esenciales en las primeras 48 horas post-infección para el control de la invasión del hongo en riñón (92).

Los datos obtenidos del presente proyecto nos permiten indicar que existen diferencias importantes durante el comportamiento de la infección en los diferentes sitios de diseminación en los ratones Rn, así como también comparándolo con los adultos, ya que el hígado y cerebro fueron los órganos mayormente afectados en los Rn con candidosis, mientras que en los animales adultos fue el riñón el órgano principalmente afectado. Además e interesantemente hemos demostrado que ajustando la cantidad de levaduras a administrar al Rn estos pueden responder adecuadamente controlando la invasión y daño del hongo en distintos tejidos, lo que posiblemente estos animales parecen estar controlando y resolviendo la infección, lo que favorece a su sobrevivencia frente a esta infección invasiva. Recientemente se ha descrito que la respuesta inmune frente a la candidosis diseminada en modelos murinos es órgano específico y dependiendo del sitio de diseminación será la respuesta que se establezca, ya sea para el control o progresión de la infección. Por lo que será interesante evaluar la respuesta inmune órgano específica en ratones Rn con candidosis invasiva, con el objetivo de tener un mayor entendimiento sobre la respuesta inmune y la patogénesis frente a esta afección durante el periodo neonatal.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES

- La mortalidad de los ratones Rn y adultos con candidosis diseminada es dependiente de la cantidad de levaduras administradas. Sin embargo, al hacer un ajuste de la cantidad de levaduras a inocular en Rn estos muestran una sobrevivencia para el último día de análisis en este estudio.
- El hígado de los animales Rn con candidosis invasiva es el órgano que presenta mayor carga fúngica, mientras en los animales adultos es el riñón.
- La carga fúngica de los tejidos de animales Rn infectados con una concentración de levaduras ajustada a su peso, muestra una reducción de la misma durante los días tardíos de la infección, debido a un posible control de la infección.
- El hígado y cerebro de Rn infectados con una concentración intermedia de *C. albicans* son los órganos mayormente afectados presentando una lesión tisular severa durante la infección, en contraste a lo demostrado en los mismos tejidos de Rn infectados con la concentración ajustada a su peso, donde la lesión tisular fue leve durante la infección con el posible control y resolución de la afección.
- Finalmente, el riñón de los ratones adultos con candidosis sistémica fue el órgano que presentó una invasión y lesión tisular severa durante la infección, y el daño severo a este tejido posiblemente es la principal causa de muerte de los ratones adultos con esta infección.

## **CAPÍTULO 6**

### **PERSPECTIVAS**

- Caracterizar y cuantificar el perfil citocinas (Th1, Th2, Th17 y Treg) en los diferentes sitios de diseminación durante la candidiasis diseminada neonatal.
  
- Analizar fenotípicamente y cuantificar las poblaciones celulares involucradas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos y linfocitos) respuesta inmune en los distintos sitios de invasión en la candidosis diseminada neonatal.
  
- Identificar y cuantificar péptidos antimicrobianos en los órganos de ratones Rn con candidosis diseminada.



## CAPITULO 7

### BIBLIOGRAFÍA

1. Bonifaz, J. Alexandro. Micología Médica Básica. [Internet]. 4<sup>a</sup> cuarta edición. McGraw-Hill; 2012 [cited 2016 May 8]. Available from: [http://www.elkar.eus/es/liburu\\_fitxa/micologia-medica-basica-4-ed/bonifaz-alexandro/9786071507440](http://www.elkar.eus/es/liburu_fitxa/micologia-medica-basica-4-ed/bonifaz-alexandro/9786071507440)
2. Da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, et al. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2016 Dec;34:111–8.
3. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol*. 2017 Feb;15(2):96–108.
4. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol*. 2012 Feb;10(2):112–22.
5. Lu Y, Su C, Liu H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends Microbiol*. 2014 Dec;22(12):707–14.
6. Romani L, Bistoni F, Puccetti P. Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Aug;6(4):338–43.
7. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005 Nov;48(6):365–77.
8. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):119–28.

9. Corzo-León DE, Armstrong-James D, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses*. 2015 Oct 1;58:34–44.
10. van de Veerdonk FL, Kullberg B-J, Netea MG. Pathogenesis of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 2010 Oct;16(5):453–9.
11. Naik S, Bouladoux N, Wilhelm C, Molloy MJ, Salcedo R, Kastenmuller W, et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science*. 2012 Aug 31;337(6098):1115–9.
12. Cassone A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG Int J Obstet Gynaecol*. 2015 May;122(6):785–94.
13. Jayatilake J a. MS, Samaranayake LP. Experimental superficial candidiasis on tissue models. *Mycoses*. 2010 Jul;53(4):285–95.
14. Kashem SW, Kaplan DH. Skin Immunity to *Candida albicans*. *Trends Immunol*. 2016 Jul;37(7):440–50.
15. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan;6(1):67–78.
16. Netea MG, Joosten LAB, van der Meer JWM, Kullberg B-J, van de Veerdonk FL. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2015 Oct;15(10):630–42.
17. Graaf CAA van der, Netea MG, Verschueren I, Meer JWM van der, Kullberg BJ. Differential Cytokine Production and Toll-Like Receptor Signaling Pathways by *Candida albicans* Blastoconidia and Hyphae. *Infect Immun*. 2005 Nov 1;73(11):7458–64.
18. Steele C, Wormley Jr FL. Immunology of fungal infections: lessons learned from animal models. *Curr Opin Microbiol*. 2012 Aug;15(4):413–9.

19. Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, et al. Dectin-2 Recognition of  $\alpha$ -Mannans and Induction of Th17 Cell Differentiation Is Essential for Host Defense against *Candida albicans*. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):681–91.
20. Cheng S-C, Joosten LAB, Kullberg B-J, Netea MG. Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. *Infect Immun*. 2012 Apr 1;80(4):1304–13.
21. Kashem SW, Igyártó BZ, Gerami-Nejad M, Kumamoto Y, Mohammed J, Jarrett E, et al. *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. *Immunity*. 2015 Feb 17;42(2):356–66.
22. MacCallum DM, Odds FC. Temporal events in the intravenous challenge model for experimental *Candida albicans* infections in female mice. *Mycoses*. 2005 May;48(3):151–61.
23. Duggan S, Leonhardt I, Hünninger K, Kurzai O. Host response to *Candida albicans* bloodstream infection and sepsis. *Virulence*. 2015 May 19;6(4):316–26.
24. Ghazal P, Dickinson P, Smith CL. Early life response to infection: *Curr Opin Infect Dis*. 2013 Jun;26(3):213–8.
25. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 2015 Oct 8;373(15):1445–56.
26. McCarty TP, Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Mar;30(1):103–24.
27. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010 Feb 1;36(1):1–53.
28. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of

- fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2012 May 1;67(5):1181–7.
29. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, Kjaeldgaard P, et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol.* 2011 Jan;49(1):325–34.
  30. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug;44(8):2816–23.
  31. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jan;20(1):133–63.
  32. Creti R, Imperi M, Berardi A, Pataracchia M, Recchia S, Alfarone G, et al. Neonatal Group B Streptococcus Infections: Prevention Strategies, Clinical and Microbiologic Characteristics in 7 Years of Surveillance. *Pediatr Infect Dis J.* 2017 Mar;36(3):256–62.
  33. Joyner JL, Augustine NH, Taylor KA, Pine TRL, Hill HR. Effects of Group B Streptococci on Cord and Adult Mononuclear Cell Interleukin-12 and Interferon- $\gamma$  mRNA Accumulation and Protein Secretion. *J Infect Dis.* 2000 Sep 1;182(3):974–7.
  34. Hill PC, Wong CG, Voss LM, Taylor SL, Pottumarthy S, Drinkovic D, et al. Prospective study of 125 cases of *Staphylococcus aureus* bacteremia in children in New Zealand. *Pediatr Infect Dis J.* 2001 Sep;20(9):868–73.
  35. Suryati BA, Watson M. *Staphylococcus aureus* bacteraemia in children: a 5-year retrospective review. *J Paediatr Child Health.* 2002 Jun;38(3):290–4.
  36. Bergin SP, Thaden JT, Ericson JE, Cross H, Messina J, Clark RH, et al. Neonatal *Escherichia coli* Bloodstream Infections: Clinical Outcomes

- and Impact of Initial Antibiotic Therapy. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Sep;34(9):933–6.
37. Chmielarczyk A, Wójkowska-Mach J, Romaniszyn D, Adamski P, Helwich E, Lauterbach R, et al. Mode of delivery and other risk factors for *Escherichia coli* infections in very low birth weight infants. *BMC Pediatr*. 2014 Oct 18;14:274.
  38. Tebruegge M, Curtis N. Enterovirus infections in neonates. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2009 Aug;14(4):222–7.
  39. Kidszun A, Klein L, Winter J, Schmeh I, Gröndahl B, Gehring S, et al. Viral Infections in Neonates with Suspected Late-Onset Bacterial Sepsis-A Prospective Cohort Study. *Am J Perinatol*. 2017 Jan;34(1):1–7.
  40. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DS, et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1999 Nov;29(5):1164–70.
  41. Rodriguez D, Almirante B, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, Sanchez F, et al. Candidemia in neonatal intensive care units: Barcelona, Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 2006 Mar;25(3):224–9.
  42. Xia H, Wu H, Xia S, Zhu X, Chen C, Qiu G, et al. Invasive Candidiasis in preterm neonates in China: a retrospective study from 11 NICUS during 2009-2011. *Pediatr Infect Dis J*. 2014 Jan;33(1):106–9.
  43. González GM, Elizondo M, Ayala J. Trends in Species Distribution and Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida* Collected in Monterrey, Mexico, to Seven Antifungal Agents: Results of a 3-Year (2004 to 2007) Surveillance Study. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep;46(9):2902–5.
  44. González GM, Treviño-Rangel R de J, Palma-Nicolás JP, Martínez C, González JG, Ayala J, et al. Species distribution and antifungal

- susceptibility of bloodstream fungal isolates in paediatric patients in Mexico: a nationwide surveillance study. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Dec 1;68(12):2847–51.
45. Kelly MS, Benjamin DK, Smith PB. The epidemiology and diagnosis of invasive candidiasis among premature infants. *Clin Perinatol.* 2015 Mar;42(1):105–117, viii–ix.
  46. Chitnis AS, Magill SS, Edwards JR, Chiller TM, Fridkin SK, Lessa FC. Trends in Candida Central Line-Associated Bloodstream Infections Among NICUs, 1999–2009. *Pediatrics.* 2012 Jul 1;130(1):e46–52.
  47. Fu J, Wang X, Wei B, Jiang Y, Chen J. Risk factors and clinical analysis of candidemia in very-low-birth-weight neonates. *Am J Infect Control.* 2016 Nov 1;44(11):1321–5.
  48. Benjamin DK, Stoll BJ, Fanaroff AA, McDonald SA, Oh W, Higgins RD, et al. Neonatal Candidiasis Among Extremely Low Birth Weight Infants: Risk Factors, Mortality Rates, and Neurodevelopmental Outcomes at 18 to 22 Months. *Pediatrics.* 2006 Jan 1;117(1):84–92.
  49. Barton M, Shen A, O'Brien K, Robinson JL, Davies HD, Simpson K, et al. Early-Onset Invasive Candidiasis in Extremely Low Birth Weight Infants: Perinatal Acquisition Predicts Poor Outcome. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2017 Apr 1;64(7):921–7.
  50. Fu J, Wang X, Wei B, Jiang Y, Chen J. Risk factors and clinical analysis of candidemia in very-low-birth-weight neonates. *Am J Infect Control.* 2016 Nov 1;44(11):1321–5.
  51. Lee JH, Hornik CP, Benjamin DK, Herring AH, Clark RH, Cohen-Wolkowicz M, et al. Risk Factors for Invasive Candidiasis in Infants >1500 g Birth Weight. *Pediatr Infect Dis J.* 2013 Mar;32(3):222–6.
  52. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, et al. Risk factors for Candida species colonization of

- neonatal intensive care unit patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2001 Dec;20(12):1119–24.
53. Hocevar SN, Edwards JR, Horan TC, Morrell GC, Iwamoto M, Lessa FC. Device-Associated Infections among Neonatal Intensive Care Unit Patients: Incidence and Associated Pathogens Reported to the National Healthcare Safety Network, 2006–2008. *Infect Control Amp Hosp Epidemiol*. 2012 Dec;33(12):1200–6.
  54. Strunk T, Currie A, Richmond P, Simmer K, Burgner D. Innate immunity in human newborn infants: prematurity means more than immaturity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2011 Jan 1;24(1):25–31.
  55. Basha S, Surendran N, Pichichero M. Immune responses in neonates. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 Sep;10(9):1171–84.
  56. Maródi L. Innate cellular immune responses in newborns. *Clin Immunol*. 2006 Feb;118(2–3):137–44.
  57. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc R Soc B*. 2015 Dec 22;282(1821):20143085.
  58. Adkins B, Leclerc C, Marshall-Clarke S. Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2004 Jul;4(7):553–64.
  59. Dasari P, Zola H, Nicholson IC. Expression of Toll-like receptors by neonatal leukocytes. *Pediatr Allergy Immunol*. 2011 Mar 1;22(2):221–8.
  60. Baley JE, Kliegman RM, Boxerbaum B, Fanaroff AA. Fungal colonization in the very low birth weight infant. *Pediatrics*. 1986 Aug;78(2):225–32.
  61. Manzoni P, Farina D, Galletto P, Leonessa M, Priolo C, Arisio R, et al. Type and number of sites colonized by fungi and risk of progression to invasive fungal infection in preterm neonates in neonatal intensive care unit. *J Perinat Med*. 2007;35(3):220–6.

62. Scharschmidt TC, Vasquez KS, Truong H-A, Gearty SV, Pauli ML, Nosbaum A, et al. A Wave of Regulatory T Cells into Neonatal Skin Mediates Tolerance to Commensal Microbes. *Immunity*. 2015 Nov 17;43(5):1011–21.
63. Evans NJ, Rutter N. Development of the epidermis in the newborn. *Biol Neonate*. 1986;49(2):74–80.
64. Neu J. Gastrointestinal development and meeting the nutritional needs of premature infants. *Am J Clin Nutr*. 2007 Feb;85(2):629S–634S.
65. Steinbach WJ, Roilides E, Berman D, Hoffman JA, Groll AH, Bin-Hussain I, et al. Results from a prospective, international, epidemiologic study of invasive candidiasis in children and neonates. *Pediatr Infect Dis J*. 2012 Dec;31(12):1252–7.
66. Tang H-J, Liu W-L, Lin H-L, Lai C-C. Clinical manifestations and prognostic factors of central line-associated candidemia. *Am J Infect Control*. 2014 Nov;42(11):1238–40.
67. Tragiannidis A, Tsoulas C, Groll AH. Invasive candidiasis and candidaemia in neonates and children: update on current guidelines. *Mycoses*. 2015 Enero;58(1):10–21.
68. Filias A, Theodorou GL, Mouzopoulou S, Varvarigou AA, Mantagos S, Karakantza M. Phagocytic ability of neutrophils and monocytes in neonates. *BMC Pediatr*. 2011;11:29.
69. Destin KG, Linden JR, Laforce-Nesbitt SS, Bliss JM. Oxidative burst and phagocytosis of neonatal neutrophils confronting *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. *Early Hum Dev*. 2009 Aug;85(8):531–5.
70. Payne MS, Kemp MW, Kallapur SG, Kannan PS, Saito M, Miura Y, et al. Intrauterine *Candida albicans* infection elicits severe inflammation in fetal sheep. *Pediatr Res*. 2014 Jun;75(6):716–22.



71. Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a University Hospital. *J Infect.* 1996 Jul 1;33(1):23–32.
72. Stoll BJ, Hansen NI, Adams-Chapman I, Fanaroff AA, Hintz SR, Vohr B, et al. Neurodevelopmental and Growth Impairment Among Extremely Low-Birth-Weight Infants With Neonatal Infection. *JAMA.* 2004 Nov 17;292(19):2357–65.
73. Zaoutis TE, Heydon K, Localio R, Walsh TJ, Feudtner C. Outcomes Attributable to Neonatal Candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2007 May 1;44(9):1187–93.
74. Baley JE, Ellis FJ. Neonatal candidiasis: ophthalmologic infection. *Semin Perinatol.* 2003 Oct;27(5):401–5.
75. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2016 Feb 15;62(4):e1-50.
76. Hope WW, Castagnola E, Groll AH, Roilides E, Akova M, Arendrup MC, et al. ESCMID\* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: prevention and management of invasive infections in neonates and children caused by *Candida* spp. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Dec;18 Suppl 7:38–52.
77. Spellberg B, Ibrahim AS, Edwards JE, Filler SG. Mice with disseminated candidiasis die of progressive sepsis. *J Infect Dis.* 2005 Jul 15;192(2):336–43.
78. MacCallum DM. Host Infection: Experimental Models to Assay *Candida* Virulence. *Int J Microbiol.* 2011 Dec 22;2012:e363764.
79. Clemons KV, Gonzalez GM, Singh G, Imai J, Espiritu M, Parmar R, et al. Development of an orogastrointestinal mucosal model of candidiasis

with dissemination to visceral organs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Aug;50(8):2650–7.

80. Koh AY. Murine models of *Candida* gastrointestinal colonization and dissemination. *Eukaryot Cell*. 2013 Nov;12(11):1416–22.
81. Bendel CM, Hess DJ, Garni RM, Henry-Stanley M, Wells CL. Comparative virulence of *Candida albicans* yeast and filamentous forms in orally and intravenously inoculated mice. *Crit Care Med*. 2003 Feb;31(2):501–7.
82. Wingard JR, Dick JD, Merz WG, Sandford GR, Saral R, Burns WH. Differences in virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis* and *Candida albicans* in mice. *Infect Immun*. 1982 Aug;37(2):833–6.
83. Gil ML, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Villamón E. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect*. 2004 Jan;6(1):1–7.
84. Netea MG, Graaf CAAV der, Vonk AG, Ineke Verschuieren, Meer JWMV der, Kullberg BJ. The Role of Toll-like Receptor (TLR) 2 and TLR4 in the Host Defense against Disseminated Candidiasis. *J Infect Dis*. 2002 May 15;185(10):1483–9.
85. Pope LM, Cole GT, Guentzel MN, Berry LJ. Systemic and gastrointestinal candidiasis of infant mice after intragastric challenge. *Infect Immun*. 1979 Aug;25(2):702–7.
86. Tsai NY, Laforce-Nesbitt SS, Tucker R, Bliss JM. A Murine Model for Disseminated Candidiasis in Neonates. *Pediatr Res*. 2011 Mar;69(3):189–93.
87. Kienstra KA, Freysdottir D, Gonzales NM, Hirschi KK. Murine Neonatal Intravascular Injections: Modeling Newborn Disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007 Nov 1;46(6):50–4.

88. Kronforst KD, Mancuso CJ, Pettengill M, Ninkovic J, Power Coombs MR, Stevens C, et al. A Neonatal Model of Intravenous *Staphylococcus epidermidis* Infection in Mice <24 h Old Enables Characterization of Early Innate Immune Responses. PLoS ONE [Internet]. 2012 Sep 6 [cited 2017 May 9];7(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3435332/>
89. Zhao J, Kim KD, Yang X, Auh S, Fu Y-X, Tang H. Hyper innate responses in neonates lead to increased morbidity and mortality after infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 27;105(21):7528–33.
90. CHONG PP, FOONG KJ, MAHA A, RUSLIZA B, NORHAFIZAH M, CHIN VK. Early expression of local cytokines during systemic *Candida albicans* infection in a murine intravenous challenge model. Biomed Rep. 2014 Nov;2(6):869–74.
91. Murphy PM, Lim JK, Lee C-CR, Lionakis MS. Organ-Specific Innate Immune Responses in a Mouse Model of Invasive Candidiasis. J Innate Immun. 2011 Feb;3(2):180–99.
92. Ngo LY, Kasahara S, Kumasaka DK, Knoblaugh SE, Jhingran A, Hohl TM. Inflammatory Monocytes Mediate Early and Organ-Specific Innate Defense During Systemic Candidiasis. J Infect Dis. 2014 Jan 1;209(1):109–19.
93. Kiserud T. Physiology of the fetal circulation. Semin Fetal Neonatal Med. 2005 Dec;10(6):493–503.
94. Norman M. Low birth weight and the developing vascular tree: a systematic review. Acta Paediatr Oslo Nor 1992. 2008 Sep;97(9):1165–72.
95. Kooijman MN, Bakker H, van der Heijden AJ, Hofman A, Franco OH, Steegers EAP, et al. Childhood kidney outcomes in relation to fetal blood flow and kidney size. J Am Soc Nephrol JASN. 2014 Nov;25(11):2616–24.

96. Sarzotti M, Robbins DS, Hoffman PM. Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science*. 1996 Mar 22;271(5256):1726–8.
97. Shi W, Bellusci S, Warburton D. Lung development and adult lung diseases. *Chest*. 2007 Aug;132(2):651–6.
98. Abitbol CL, Rodriguez MM. The long-term renal and cardiovascular consequences of prematurity. *Nat Rev Nephrol*. 2012 Feb 28;8(5):265–74.
99. Timens W, Rozeboom T, Poppema S. Fetal and neonatal development of human spleen: an immunohistological study. *Immunology*. 1987 Apr;60(4):603–9.
100. Chahboune H, Ment LR, Stewart WB, Rothman DL, Vaccarino FM, Hyder F, et al. Hypoxic injury during neonatal development in murine brain: correlation between in vivo DTI findings and behavioral assessment. *Cereb Cortex N Y N 1991*. 2009 Dec;19(12):2891–901.
101. Guellec I, Gascoin G, Beuchee A, Boubred F, Tourneux P, Ramful D, et al. Biological Impact of Recent Guidelines on Parenteral Nutrition in Preterm Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015 Dec;61(6):605–9.
102. Miller M, Donda K, Bhutada A, Rastogi D, Rastogi S. Transitioning Preterm Infants From Parenteral Nutrition: A Comparison of 2 Protocols. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2016 Aug 18;
103. Dobbing J, Sands J. Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child*. 1973 Oct;48(10):757–67.
104. Inder T, Neil J, Kroenke C, Dieni S, Yoder B, Rees S. Investigation of Cerebral Development and Injury in the Prematurely Born Primate by Magnetic Resonance Imaging and Histopathology. *Dev Neurosci*. 2005;27(2–4):100–11.

105. Olavarria J, Van Sluyters RC. Organization and postnatal development of callosal connections in the visual cortex of the rat. *J Comp Neurol*. 1985 Sep 1;239(1):1–26.
106. Tzarouchi LC, Drougia A, Zikou A, Kosta P, Astrakas LG, Andronikou S, et al. Body growth and brain development in premature babies: an MRI study. *Pediatr Radiol*. 2014 Mar;44(3):297–304.
107. Jia Q, McDill BW, Sankarapandian B, Wu S, Liapis H, Holzman LB, et al. Ablation of developing podocytes disrupts cellular interactions and nephrogenesis both inside and outside the glomerulus. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Dec;295(6):F1790-1798.
108. Behrens A, Sibilio M, David J-P, Möhle-Steinlein U, Tronche F, Schütz G, et al. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J*. 2002 Apr 1;21(7):1782–90.
109. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Dev Camb Engl*. 2015 Jun 15;142(12):2094–108.
110. Orme IM, Basaraba RJ. The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Semin Immunol*. 2014 Dec;26(6):601–9.